

8/5/1
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012438168
WPI Acc No: 1999-244276/199920
XRAM Acc No: C99-071294

Liquid formulation of interferon-beta
Patent Assignee: RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH (RENT)
Inventor: HOFER H; SCHROEDER P; SIKLOSI T; TSCHOEPE M
Number of Countries: 025 Number of Patents: 003
Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9915193	A1	19990401	WO 98EP6065	A	19980923	199920 B
AU 9896276	A	19990412	AU 9896276	A	19980923	199934
EP 1017413	A1	20000712	EP 98950074	A	19980923	200036
			WO 98EP6065	A	19980923	

Priority Applications (No Type Date): EP 97116562 A 19970923

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9915193	A1	G	51	A61K-038/21	
Designated States (National): AU CA IL JP KR US					
Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE					
AU 9896276	A				Based on patent WO 9915193
EP 1017413	A1	G		A61K-038/21	Based on patent WO 9915193
Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE					

Abstract (Basic): WO 9915193 A1

NOVELTY - Stable interferon-beta (I) solution of neutral or slightly acid pH (pH 5-8) is new.

DETAILED DESCRIPTION - Liquid formulations of human (I), that retain at least 80% of in vitro biological activity after storage for 3 months at 25 degrees Centigrade, contain up to 25 MU (units)/ml of (I), are buffered to pH 5-8, preferably over 5.5, and are free of human serum albumin (HSA); are buffered to pH 6-7.2 and are free of HSA, or are buffered to pH 5-8, preferably over 5.5, and contain at least one amino acid.

ACTIVITY - Antiviral; antiproliferative; immunomodulatory.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - Interferons are known as antiviral, antiproliferative and immunomodulatory agents.

ADVANTAGE - The formulations have high stability (of biological activity and of molecular and physical integrity); eliminate the expense of freeze-drying and reconstitution, and do not require potentially hazardous additives (serum albumin or detergents). They may even be stored for a month at 37 degrees Centigrade and still retain at least 70% of biological activity. A formulation, of pH 7, contained 50 mM sodium phosphate, 50 mg/ml glycerol, 2 mM methionine and 12.5 MU/ml (I). After 6 months storage at 25 degrees Centigrade, recovery of biological activity (assessed conventionally by inhibition of the cytopathic effect of a virus) was 13.4 MU/ml, i.e. 107.2% of the initial value and 172% of a control that had been stored for 6 months at -20 degrees Centigrade.

pp; 51 DwgNo 0/0

Best Available Copy

Title Terms: LIQUID; FORMULATION; INTERFERON; BETA
Derwent Class: A96; B04
International Patent Class (Main): A61K-038/21
International Patent Class (Additional): A61K-009/08
File Segment: CPI

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 38/21, 9/08	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15193 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. April 1999 (01.04.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06065</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 23. September 1998 (23.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 97116562.6 23. September 1997 (23.09.97) EP</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DR. RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Erwin-Rentschler-Strasse 21, D-88471 Laupheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TSCHÖPE, Michael [DE/DE]; Kastanienweg 72, D-88400 Biberach (DE). SIKLOSI, Thomas [DE/DE]; Alpenweg 15, D-88487 Walpertshofen (DE). SCHROEDER, Peter [DE/DE]; Hopfenweg 17, D-88471 Laupheim (DE). HOFER, Hans [DE/DE]; Beim Käppele 11, D-88487 Walpertshofen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, IL, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: LIQUID INTERFERON-β FORMULATIONS</p> <p>(54) Bezeichnung: FLÜSSIGE INTERFERON-β-FORMULIERUNGEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to liquid formulations of human interferon-β. The inventive formulations are characterised in that they have a buffer with a pH value in the slightly acidic to neutral range between 5 and 8, preferably between 5.5 and 8, and in that the interferon-β is highly stable in solution, the molecular integrity being preserved.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft flüssige Formulierungen von humanem Interferon-β. Die Formulierungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Puffer mit einem pH-Wert im schwach sauren bis neutralen Bereich zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8 aufweisen sowie eine hohe Stabilität des Interferon-β in Lösung unter Beibehalt der molekularen Integrität gegeben ist.</p>		

Best Available Copy

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Flüssige Interferon- β Formulierungen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft flüssige Formulierungen von humanem Interferon- β . Die Formulierungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie einen pH-Wert im schwach sauren bis neutralen Bereich zwischen 5 und 8 aufweisen sowie eine hohe Stabilität des Interferon- β in Lösung unter
10 Beibehalt der molekularen Integrität gegeben ist.

Natürlich vorkommende Interferone sind speziesspezifische Proteine, teilweise Glykoproteine, die durch unterschiedliche Zellen des Körpers nach Induktion mit Viren, doppelsträngiger RNA, anderen Polynukleotiden sowie
15 Antigenen erzeugt werden. Interferone besitzen zahlreiche biologische Aktivitäten wie z.B. antivirale, antiproliferative sowie immunmodulatorische Eigenschaften. Es sind mindestens 3 unterschiedliche Typen humaner Interferone identifiziert worden, welche durch Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten sowie Zellen des Immunsystems produziert werden und als α -,
20 β -, γ -Interferone bezeichnet werden. Einzelne Interferontypen können weiterhin in zahlreiche Subtypen unterteilt werden.

Natives, menschliches Interferon- β kann durch Superinduktion humaner Fibroblastenzellkulturen mit Poly-IC sowie anschließende Isolierung und
25 Reinigung des Interferon β durch chromatographische und elektrophoretische Techniken industriell hergestellt werden. Proteine oder Polypeptide, welche dem natürlichen Interferon- β vergleichbare Eigenschaften aufweisen, können auch durch rekombinante DNA-Technologien hergestellt werden (EP-A-0 028 033; EP-A- 0 041 313; EP-A-0 070 906; EP-A-0 287 075;
30 Chernajovsky et al. (1984) DNA 3, 297-308; McCormick et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4, 166-172). Dabei kann rekombinantes humanes Interferon- β sowohl in eukaryontischen Zellen (z.B. CHO-Zellen) als auch von prokaryon-

tischen Zellen (z.B. E.coli) produziert werden. Die entsprechenden Interferone werden als Interferon- β -1a bzw. Interferon- β -1b bezeichnet. Im Gegensatz zu Interferon- β -1b ist Interferon- β -1a glykosiliert (Goodkin (1994) Lancet 344, 1057-1060).

5

Der therapeutische Einsatz von Interferon- β setzt voraus, daß es in eine galenische Zubereitung gebracht wird, die das Protein über längere Zeit unter Erhaltung der molekularen Integrität lagerfähig macht. Interferon- β ist instabil und unterliegt unterschiedlichen Abbaureaktionen. Hierzu gehören insbesondere die Spaltung von Peptidbindungen, Deamidierung, Oxidation des Methionins zu Methioninsulfid, Disulfidaustausch sowie Veränderungen der Zuckerseitenkette bis hin zur Deglycosilierung.

Aufgrund des therapeutischen Nutzens von Interferonen sind in den vergangenen Jahren eine Reihe von Formulierungen entwickelt worden, die jedoch alle gewisse Nachteile aufweisen. Das US-Patent Nr. 4,647,454 (Inter-Yeda Ltd.) beschreibt eine Formulierung von Fibroblasten Interferon- β , die durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP) im stark sauren Bereich (pH 3,5) stabilisiert werden kann. Weitere bevorzugte Hilfsstoffe sind Mannitol, Humanserumalbumin sowie Acetatpuffer. Die Formulierung wird gefriergetrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

Die japanische Patentschrift 59 181 224 (Sumitomo Chemical Co.) beschreibt eine wässrige Lösung von Interferonen, bei welcher polare Aminosäuren wie Arginin, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Histidin, Lysin, Serin sowie Threonin bzw. deren Natriumsalze zusammen mit Humanserumalbumin zur Stabilisierung der Interferone eingesetzt werden.

Die internationale Patentanmeldung WO 95/31213 (Applied Research Systems ARS Holding) beschreibt eine flüssige Formulierung für Interferon- β , die durch Zusatz eines Polyols, bevorzugt Mannitol, und eines nicht-reduzierenden Zuckers oder einer Aminosäure stabilisiert wird. Die

Formulierung enthält weiterhin einen Puffer (Acetatpuffer pH 3,0 bis 4,0) sowie Humanserumalbumin. Während Rezepturen mit einem pH-Wert zwischen 5 und 6 einen sofortigen Verlust an biologischer Aktivität zeigten, sind die in der Patentschrift bevorzugten Rezepturen bei pH-Werten von 3,0
5 sowie 4,0 hinreichend stabil. Die Aussage der Stabilität bezieht sich außerdem nur auf die biologische Aktivität der Formulierung, nicht aber auf die molekulare Integrität des Wirkstoffs.

Die europäische Patentanmeldung EP 0 215 658 (Cetus Corp.) beschreibt
10 eine Formulierung für rekombinantes Interferon- β , in welcher die biologisch aktive Verbindung in einem wässrigen Medium bei einem pH-Wert zwischen 2 und 4 unter Zusatz von Stabilisatoren wie Humanserumalbumin oder Humanplasmaproteinfraktionen sowie gegebenenfalls Dextrose gelöst wird. Eine weitere Patentanmeldung der Cetus Corp. (WO 89/05158) beschreibt
15 eine Formulierung für Interferon- β , die bei einem pH-Wert zwischen 2 und 4 als Stabilisatoren entweder Glycerin oder Polyethylenglycopolymere mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 190 bis 1.600 Dalton einsetzen. Als geeignete Pufferkomponenten werden Glycin, Phosphorsäure sowie Zitronensäure genannt.

20 Die europäische Patentanmeldung EP 0 217 645 (Cetus Corp.) beschreibt pharmazeutische Zubereitungen mit IL-2 oder Interferon- β , die in einem Trägermedium bei pH 7 bis 8 gelöst und unter Zusatz von Natriumlaurat als oberflächenaktive Verbindung stabilisiert sind. Darüber hinaus wird zur
25 Stabilisierung dieser Zubereitungen auch SDS als weitere ionische oberflächenaktive Verbindung benötigt.

Das europäische Patent EP 0 270 799 (Cetus Oncology Corp.) beschreibt eine Formulierung für nichtglycosiliertes rekombinantes Interferon- β in einem
30 inerten Trägermedium auf Wasserbasis, das als Stabilisator nichtionische polymere Detergenzien enthält.

Die europäische Patentanmeldung EP 0 529 300 (Rentschler Biotechnologie GmbH) beschreibt flüssige Interferon- β -Formulierungen, die eine Konzentration von 30 bzw. 70 MU/ml rekombinantes IFN- β , Natriumchlorid und Imidazol- bzw. Natriumphosphatpuffer enthalten sowie einen pH-Wert von 7,5 aufweisen (Beispiel 3). Diese Formulierungen sind für 4 Wochen bei einer Lagertemperatur von 25°C hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität stabil. Diese Zusammensetzungen haben jedoch den Nachteil, daß die verwendete Konzentration von Interferon- β (≥ 30 MU/ml) für praktische Anwendungen zu hoch ist. Darüber hinaus findet sich in EP-A-0 529 300 keinerlei Hinweis, daß durch Zusatz von Humanserumalbumin die Stabilität von flüssigen Interferon- β Formulierungen verringert wird. Im Gegenteil wird der Zusatz von Humanserumalbumin als bevorzugt bezeichnet.

Neben Formulierungen für Interferon- β sind auch pharmazeutische Darreichungsformen mit Interferon- α beschrieben. Die europäische Patentschrift 0 082 481 (Schering Corp.) offenbart eine zur Gefriertrocknung bestimmte wässrige Formulierung, die neben einem Phosphatpuffer und Glycin Humanserumalbumin enthält. Als weiterer optionaler Bestandteil wird Alanin genannt. Der pH-Wert der Lösung nach Rekonstitution liegt zwischen 7,0 und 7,4. Eine weitere Patentanmeldung der Schering Corp. (WO 96/11018) offenbart stabile wässrige Lösungen im Interferon- α , die bei einem pH-Wert zwischen 4,5 und 7,1 Chelatbildner (NaEDTA oder Zitronensäure), eine oberflächenaktive Verbindung (Polysorbat 80), ein Isotonisierungsmittel (Natriumchlorid) sowie geeignete Konservierungsmittel wie Methylparaben, Propylparaben, m-Kresol oder Phenol beinhalten. Die offenbarten wässrigen Formulierungen erweisen sich bezüglich der biologischen Aktivität (Standardmethode der Hemmung des zytopathischen Effekts (CPE) eines Virus wie beschrieben bei W.P. Protzman in J. Clinical Microbiology, 1985, 22, S. 596-599) bei 25°C für 6 Monate als stabil (biologische Aktivität $> 90\%$ der Ausgangsaktivität). Eine parallel durchgeführte Bestimmung des Proteingehalts mittels HPLC weist nach 6

Monaten bei 25°C jedoch bereits Gehaltsverluste zwischen 20,2 (Tab.3) oder 32,5% (Tab. 4) aus.

5 EP-A-0 736 303 (Hoffmann-LaRoche AG) offenbart wäßrige Interferon- α -Zusammensetzungen, die neben einem Interferon- α ein nichtionisches Detergens, einen Puffer zur Einstellung des pH-Bereiches zwischen 4,5 und 5,5, Benzylalkohol und gegebenenfalls ein isotonisierendes Mittel umfassen. Bei Bestimmung mittels HPLC wird nach dreimonatiger Lagerung bei 25°C und einer Ausgangskonzentration von 18 MU Interferon- α 2a ein Restgehalt
10 von 84,5 % ermittelt, bei Weglassen des Stabilisators Benzylalkohol sinkt dieser Wert auf 62,8 %.

EP-A-0 641 567 (Ciba Geigy AG) beschreibt pharmazeutische Zusammen-
15 setzungen, die Hybrid-Interferon- α und als Stabilisator einen Puffer mit einem pH-Wert zwischen 3.0 und 5.0 enthalten.

Das US-Patent 5,358,708 (Schering Corp.) beschreibt wässrige Formulie-
rungen von Interferon- α , die als Stabilisator Methionin, Histidin oder
Mischungen davon enthalten. Nach zweiwöchiger Lagerung einer Interferon-
20 α Lösung bei 40°C wird eine Abnahme des Wirkstoffgehalts um 20 %
gefunden.

Die oben aufgeführten Formulierungen für Interferone sind aus heutiger
Sicht mit Nachteilen behaftet, da z.B. auf Zusatz von Humanserumalbumin
25 zur Stabilisierung von Proteinen aus Gründen der gestiegenen Anforderun-
gen an die Sicherheit vor Viruskontaminationen durch Blutspender verzichtet
werden sollte. Desweiteren ist für eine Vielzahl der oben beschriebenen
Formulierungen ein Zusatz von Aminosäuren und/oder eine Gefriertrocknung
erforderlich. Gefriergetrocknete Produkte sind jedoch in ihrer Herstellung
30 sehr aufwendig und entsprechend teuer und erfordern durch die Notwendig-
keit zur Rekonstitution einen zusätzlichen Arbeitsschritt, der insbesondere
für Patienten mit eingeschränkter Motorik oftmals nur sehr schwer zu

vollziehen ist. Eine Reihe von Rezepturen weisen unphysiologische pH-Werte unterhalb von 5,0 auf. Obschon derartige Werte nicht gänzlich unüblich sind (siehe auch S. Sweetana und N.J. Aders, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology*, 1996, 50: 330-342), muß bei intramuskulärer oder subkutaner Applikation mit schmerzhaften Irritationen gerechnet werden. Die Verwendung von oberflächenaktiven Verbindungen, wie Polysorbat 80, ist entsprechend Sweetana und Akers zwar zulässig, es sind jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen insbesondere auch bei Kindern und Neugeborenen beschrieben, die den Einsatz derartiger Hilfsstoffe in Frage stellen. Über die Toxizität von oberflächenaktiven Verbindungen wird zusammenfassend bei Attwood und Florence (*Surfactant Systems, their Chemistry, Pharmacy and Biology*, Chapman and Hall; London, 1983) berichtet. Eine Übersicht über die Pharmakologie von Polysorbat 80 befindet sich bei R.K. Varma et al. (*Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* 35, 1985, 804-808).

Aufgrund der oben genannten Nachteile, sollte eine optimale Formulierung für Interferon- β folgende Eigenschaften in sich vereinigen:

- Erhalt der biologischen Aktivität über den Lagerzeitraum,
- Erhalt der molekularen Integrität des Wirkstoffmoleküls über den Lagerzeitraum,
- Flüssige Formulierung, Verzicht auf eine teure Gefriertrocknung sowie eine zusätzliche Rekonstitution,
- Verzicht auf risikobehaftete Hilfsstoffe wie Humanserumalbumin oder oberflächenaktive Verbindungen (Detergenzien),
- pH-Wert im neutralen bis schwach sauren Bereich.

Sämtliche Forderungen werden durch die im nachfolgenden Abschnitt genauer beschriebene Erfindung erfüllt.

Überraschenderweise wurde eine Rezepturzusammensetzung gefunden, welche die molekulare Integrität von Interferon- β in flüssiger Form über einen langen Zeitraum in einem physiologischen pH-Bereich zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8 sicherstellt, ohne auf die als nachteilig
5 bekannten Hilfsstoffe des Standes der Technik zurückgreifen zu müssen.

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist daher eine flüssige pharmazeutische Formulierung, die humanes Interferon- β als Wirkstoff in einer Konzentration bis zu 25 MU/ml und einen Puffer zur Einstellung eines pH-
10 Werts von zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8 enthält, frei von Humanserumalbumin ist und eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Formulierung, die humanes Interferon- β als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eine pH-Werts zwischen 6 und 7,2 enthält, frei von Humanse-
15 rumalbumin ist und eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für 3
20 Monate aufweist.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Formulierung, die humanes IFN- β als Wirkstoff, einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8
25 und eine oder mehrere Aminosäuren enthält und eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.

Die Messung der Langzeitstabilität von flüssigen pharmazeutischen Formu-
30 lierungen erfolgte bei 25°C. Die Temperatur von 25°C wurde gewählt, um auf der einen Seite eine Beschleunigung von Abbaureaktionen zu bewirken, auf der anderen Seite jedoch keine durch überhöhte Temperaturen bewirk-

ten Artefakte hervorzurufen. Geeignete analytische Methoden zur Bestimmung der Stabilität von Interferon- β sind in den Übersichtsartikeln von J. Geigert (J. Parent. Sci. Technol. 43 (1989), 220-224) oder M.C. Manning, K. Patel und R.T. Borchardt (Pharm. Res. 6 (1989), 903-918) beschrieben.

5

Die Messung der biologischen Aktivität nach der jeweils gewählten Aufbewahrungsdauer erfolgte durch die Standardmethode der Inhibierung des zytopathischen Effekts eines Virus. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Testmethode findet sich bei Stewart, W.E. II (1981): The Interferon System (Second, enlarged Edition), Springer-Verlag: Wien, New York; Grossberg, S.E. et al. (1984), Assay of Interferons. In: Came, P.E., Carter W.A (eds) Interferons and their Applications, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43. Eine erfindungsgemäße Formulierung weist nach dreimonatiger Aufbewahrung bei 25°C eine biologische Aktivität von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 85% und besonders bevorzugt von mindestens 90% der Ausgangsaktivität auf.

10

15

20

Vorzugsweise besitzt eine erfindungsgemäße Formulierung nach sechsmonatiger Aufbewahrung bei 25°C eine biologische Aktivität von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 85% der Ausgangsaktivität.

25

Auch bei einer Aufbewahrung bei höheren Temperaturen, z.B. 37°C, weisen die erfindungsgemäßen Formulierungen eine überraschend hohe Langzeitstabilität der biologischen Aktivität auf. So wird nach einer einmonatigen Aufbewahrung bei 37°C eine biologische Aktivität von mindestens 70% und vorzugsweise von mindestens 80% der Ausgangsaktivität gefunden.

30

Die erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierungen sind vorzugsweise frei von Humänservalbumin und besonders bevorzugt - abgesehen vom Wirkstoff - frei von humanen oder tierischen Polypeptiden insbesondere von Serumproteinen. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäße flüssige pharmazeutische Formulierung frei von

oberflächenaktiven Mitteln, insbesondere frei von ionischen Detergenzien oder/und nichtionischen Tensiden ist.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen enthalten als Wirkstoff ein Interferon- β , d.h. ein Polypeptid, welches biologische oder/und immunologische Eigenschaften von natürlichem humanem Interferon- β aufweist und ein natürlich vorkommendes oder rekombinantes Interferon- β sein kann. Vorzugsweise enthält die Formulierung ein glykosiliertes Interferon- β , besonders bevorzugt ein rekombinantes Interferon- β aus CHO-Zellen. Am meisten bevorzugt werden Interferon- β Spezies verwendet, wie sie aus der Zelllinie BIC 8622 (ECACC 87 04 03 01) erhältlich sind und beispielsweise in EP-B-O 287 075 und EP-A-O 529 300 beschrieben sind.

Der Wirkstoff liegt in den erfindungsgemäßen Formulierungen vorzugsweise in einer Konzentration bis zu 25 MU/ml vor. Bevorzugt ist jedoch eine Dosierung im Bereich von 1 bis 25 MU/ml, besonders bevorzugt von 3 bis 20 MU/ml, am meisten bevorzugt 3 bis 10 MU/ml. Diese Dosierungsbereiche erlauben eine unmittelbare Anwendung ohne weitere Verdünnung in Verbindung mit einer besonders guten Stabilität bei erhöhter Temperatur.

Ein weiteres bevorzugtes Merkmal der erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierung ist, daß sie eine chemische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate und vorzugsweise für 6 Monate aufweist, d.h. daß sie beständig gegenüber Peptidspaltung, Oxidation und Deglykosylierung ist. Die Messung der chemischen Integrität erfolgt durch Peptidmapping, Westernblot sowie Glykosylierungsanalyse. Als chemisch stabil im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind Zusammensetzungen zu betrachten, bei welchen das Interferon- β im Anschluß an die Formulierung mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90% der chemischen Integrität bei den gewählten Lagerungsbedingungen beibehält.

Ein weiteres bevorzugtes Merkmal der erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierungen ist eine physikalische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate und vorzugsweise für 6 Monate. Dabei wird die physikalische Integrität durch Messung der Transmission bei 420 nm sowie durch visuelle Betrachtung der Lösungen gemessen. Als physikalisch stabil sind diejenigen Lösungen anzusehen, deren Transmission über 90%, vorzugsweise über 93% bei den gewählten Lagerungsbedingungen liegt, und bei welchen keine Trübung bei visueller Betrachtung festgestellt werden kann.

Durch die vorliegende Erfindung können überraschenderweise flüssige Formulierungen von Interferon- β bereitgestellt werden, die über einen langen Zeitraum biologisch, chemisch und physikalisch stabil sowie frei von unerwünschten Inhaltsstoffen wie etwa Humanserumalbumin oder oberflächenaktiven Mitteln sind. Die erfindungsgemäßen Formulierungen enthalten neben dem Wirkstoff einen Puffer, der vorzugsweise in einer Konzentration von 10 mmol/l bis 1 mol/l, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 20 mmol/l bis 200 mmol/l, z.B. ca. 50 mmol/l bis 100 mmol/l vorliegt und dazu dient, den pH-Wert der Formulierung im Bereich von 5 bis 8, bevorzugt von größer 5,5 bis 8 und stärker bevorzugt zwischen 6 und 7,4 zu halten. Besonders bevorzugt ist ein pH-Bereich zwischen 6 und 7,2 und am meisten bevorzugt zwischen 6,2 und 6,8, da hier eine besonders hohe Stabilität unter Beibehalt der molekularen Integrität erreicht wird. Der Puffer wird aus pharmazeutisch akzeptablen Puffern ausgewählt, z.B. Borat-, Succinat-, L-Malat-, TRIS-, Salicylat-, Glycylglycin-, Triethanolamin-, Isocitrat-, Maleat-, Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffer oder Mischungen davon. Bevorzugt verwendet man Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffer oder Mischungen davon, besonders bevorzugt Phosphat/Citratpuffer.

Die erfindungsgemäße Formulierung kann neben dem Wirkstoff und dem Puffer weitere physiologisch verträgliche Hilfsstoffe enthalten, beispielsweise Hilfsstoffe zur Anpassung der Tonizität an die Tonizität des Blutes

oder Gewebe, z.B. nichtreduzierende Zucker, Zuckeralkohole wie Mannit, Sorbit, Xylit oder Glycerin. Außerdem können der erfindungsgemäßen Formulierung eine oder mehrere Aminosäuren wie z.B. Alanin, Arginin, Glycin, Histidin oder/und Methionin zur weiteren Erhöhung der chemischen Stabilität zugesetzt werden. Bevorzugt ist hierbei Methionin. Die Konzentration von Methionin liegt vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 4 mmol/l. Besonders bevorzugt ist eine Konzentration vom 2 mmol/l. Weiterhin kann die Zusammensetzung Verdickungsmittel zur Viskositätserhöhung, z.B. für ophthalmologische Zwecke, enthalten. Beispiele für geeignete Verdickungsmittel sind ophthalmologisch geeignete Polymere, z.B. Carbopol, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose etc.

Darüber hinaus kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung auch Konservierungsmittel enthalten. Für ophthalmologische Zwecke kann beispielsweise Thiomersal in einer Menge von 0,001 bis 0,004% (Gewicht/Volumen) zum Einsatz kommen.

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Präparate, die eine flüssige Interferon- β enthaltende Formulierung wie oben beschrieben enthalten. Diese pharmazeutischen Präparate sind insbesondere für die orale, parenterale oder ophthalmologische Applikation geeignet. Die Formulierungen liegen vorzugsweise in Einzeldosen von 1 bis 25 MU IFN- β vor. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung derartiger pharmazeutischer Präparate, wobei man eine erfindungsgemäße Formulierung und gegebenenfalls weitere galenisch notwendige Hilfsstoffe zubereitet und in eine geeignete Darreichungsform bringt.

Die erfindungsgemäße Formulierung kann in geeigneten, gewaschenen sowie sterilisierten Glasvials (hydrolytische Klasse 1) mit pharmazeutisch akzeptablen Gummistopfen gelagert werden.

Desweiteren können erfindungsgemäße Formulierungen auch aseptisch in Fertigspritzen oder aber in Karpulen zum Einsatz in Selbstinjektionssystemen abgefüllt und eingesetzt werden. Die wässrigen Lösungen können - obwohl dies nicht bevorzugt ist - durch Zusatz weiterer, dem Fachmann bekannter Hilfsstoffe gefriergetrocknet werden und stehen dann nach Rekonstitution in flüssiger Form zur Verfügung.

Unter Zusatz von geeigneten Konservierungsmitteln können flüssige Mehrfachdosisarzneiformen sowie Augentropfenlösungen und Tropflösungen zur oralen Applikation hergestellt werden.

Die zur Herstellung der entsprechenden Darreichungsformen noch zusätzlich benötigten Hilfsstoffe sind dem Fachmann bekannt.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit einer flüssigen Formulierung, die humanes Interferon- β als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8, bevorzugt von größer 5,5 bis 8 enthält, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Formulierung ohne Human-serumalbumin oder/und mit einer oder mehreren Aminosäuren verwendet. Die Verbesserung der Haltbarkeit umfaßt eine Verbesserung der Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro), der chemischen Integrität oder/und der physikalischen Integrität wie vorstehend angegeben.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiele

In allen Beispielen wurde ein aus CHO-Zellen gewonnenes Interferon- β verwendet.

30

1. Langzeitstabilität von flüssigen Interferon- β Formulierungen bei 25°C

Es wurden folgende Formulierungen getestet:

- Formulierung 1: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0
- Formulierung 2: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l, Natriumphosphat
pH 7,0, 15 mg/ml Humanserumalbumin, 2 mmol/l
Methionin, 50 mg/ml Glycerin
- 5 Formulierung 3: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat
pH 7,0, 50 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methionin
- Formulierung 4: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat
pH 7,0, 2 mmol/l Methionin
- Formulierung 5: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat
10 pH 7,0
- Formulierung 17: 70 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat,
2 mmol/l Methionin, pH 6,5

Die Formulierungen wurden auf einen Gehalt von ca. 10 bis 15 MU/ml (d.h.
15 10 bis 15 x 10⁶ I.E./ml) verdünnt.

Die Formulierungen wurden mit Ausnahme von Formulierung 17 (s.u.) in
Glasvials der hydrolytischen Klasse 1 (DIN 2R Vials), die mit handelsübli-
chen Chlorbuthylgummistopfen verschlossen waren, bei 25°C für die
20 angegebene Zeitdauer gelagert. Die Bestimmung der biologischen Aktivität
(in vitro) erfolgte, wie beschrieben bei Stewart, W.E. II (1981): The
Interferon System (Second, enlarged edition) Springer-Verlag: Wien, New
York; Grossberg, S.E. et al. (1984) Assay of Interferons. In: Came, P.E.,
Carter W.A. (eds.) Interferons and their Applications, Springer-Verlag:
25 Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 5 dargestellt. Bei "% (Ref)"
handelt es sich um die Angabe der biologischen Aktivität bezogen auf die
biologische Aktivität einer bei -20°C für den angegebenen Zeitraum
30 gelagerten Referenzprobe. Bei "% (OMo)" handelt es sich um die prozentu-
ale biologische Aktivität bezogen auf den Ausgangswert bei 0 Monaten.

Tabelle 1 (Formulierung 1):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	11,0	11,0	100	100
1	10,0	9,8	98	89
2	9,7	11,0	113	100
3	10,0	10,6	106	96
4	10,3	9,5	92	86
5	9,5	9,7	102	88
6	10,5	10,2	97	93

Tabelle 2 (Formulierung 2):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	13,9	13,9	100	100
1	14,0	11,9	85	86
2	13,0	11,6	89	83
3	13,1	9,6	73	69
4	12,5	8,8	70	63
5	11,0	8,2	75	59
6	13,3	8,4	63	60

Tabelle 3 (Formulierung 3):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	12,5	12,5	100	100
1	9,4	10,0	106	80
2	8,3	11,5	139	92
3	7,8	11,8	151	94,4
4	6,8	10,3	151	82,4
5	6,6	11,2	170	89,6
6	7,8	13,4	172	107,2

Tabelle 4 (Formulierung 4):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	11,4	11,4	100	100
1	10,5	10,2	97	89
2	11,9	11,1	93	97
3	10,2	10,0	93	88
4	10,4	9,3	89	82
5	11,6	8,4	72	74
6	12,4	9,5	77	83

Tabelle 5 (Formulierung 5):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	11,3	11,3	100	100
1	11,0	9,7	88	86
2	11,7	10,1	86	89
3	11,1	10,2	92	90
4	11,3	10,2	90	90
5	12,0	9,2	77	81
6	11,0	9,7	88	86

Aus den obigen Tabellen ist ersichtlich, daß Formulierungen, die kein Humanserumalbumin enthalten (Formulierungen 1, 3, 4, 5), überraschenderweise eine bessere Stabilität als eine Humanserumalbumin enthaltende Formulierung (Formulierung 2) aufweisen.

Bei Formulierung 17 (s.o.) wurde eine Interferonlösung ohne Humanserumalbumin unter aseptischen Bedingungen auf eine Aktivität von 6 MU/0,5 ml eingestellt. Die farblose, klare Lösung wurde anschließend sterilfiltriert und zu je 0,5 ml in vorsterilisierten Einmalspritzen abgefüllt und verschlossen. Die Fertigspritzen wurden bei 25°C gelagert und auf Klarheit, pH-Wert sowie biologische Aktivität untersucht. Dabei ergaben sich folgende Resultate:

Lagerung in Mona- ten	pH- Wert	Klarheit [%]	MU/Spritze		Recovery (25°C)	
			-20°C	25°C	%(Ref.)	%(OMo.)
0	6,5	99,5	6,3	6,3	100	100
3	6,5	99,1	5,6	6,1	108	97

2. Langzeitstabilität von flüssigen IFN- β Formulierungen bei 37°C

Es wurden folgende Formulierungen in Fertigspritzen getestet:

Formulierung 6: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat
pH 7,0, 2 mmol/l Methionin

Formulierung 7: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0, 18 mg/ml Glycerin, 2
mmol/l Methionin

Formulierung 8: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0, 18 mg/ml Glycerin, 15
mg/ml Humanserumalbumin, 2 mmol/l Methionin

Formulierung 9: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 6,0, 18 mg/ml Glycerin, 2
mmol/l Methionin

Formulierung 10: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 6,5, 18 mg/ml Glycerin, 2
mmol/l Methionin

Die Formulierungen wurden in Dosisstärken von 3 MU pro 0,5 ml (Dosis-
stärke 3), 6 MU pro 0,5 ml (Dosisstärke 6) und 12 MU pro ml (Dosisstärke
12) getestet.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Lagerung in Monaten	Dosisstärke 3										Dosisstärke 6										Dosisstärke 12									
	Formulierung										Formulierung										Formulierung									
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	71	80	61	74	69	72	85	63	86	84	72	85	63	86	84	87	88	71	76	84	87	88	71	76	84	87	88	71	76	84
2	51	82	33	74	85	61	81	43	80	76	61	81	43	80	76	69	88	48	77	81	69	88	48	77	81	69	88	48	77	81
3	44	76	23	63	65	48	64	36	73	69	48	64	36	73	69	66	72	35	80	81	66	72	35	80	81	66	72	35	80	81
4	33	51	16	61	61	46	65	26	84	-	46	65	26	84	-	-	64	24	78	79	-	64	24	78	79	-	64	24	78	79

Aus den Ergebnissen von Tabelle 6 ist ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen Formulierungen ohne Humanserumalbumin überraschenderweise eine verbesserte Stabilität bei 37°C aufweisen.

5 3. Chemische Stabilität bei 25°C

Um die chemische Stabilität flüssiger Formulierungen von IFN- β zu untersuchen, wurden 7 Ansätze formuliert und bei 25°C eingelagert. Nach 3 bzw. 6 Monaten erfolgte eine Charakterisierung des Proteins mittels eines
10 Lys-C-Mappings und einer kompletten Kohlenhydratanalytik. Ein spezielles Augenmerk wurde auf die Bildung von Methionin-Sulfoxid und die Desialylierung gelegt.

Außer Formulierung 10 (s.o.) wurden folgende Formulierungen getestet:

15

Formulierung 11: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat, 2 mmol/l Methionin pH 7,0 bis 7,2

Formulierung 12: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat pH 7,0 bis 7,2

20 Formulierung 13: 50 mmol/l Natriumcitrat, 18 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methionin, pH 5,0 bis 5,2

Formulierung 14: 50 mmol/l Natriumcitrat, 18 mg/ml Glycerin, pH 5,0 bis 5,2

Formulierung 15: 50 mmol/l Natriumcitrat, 15 mg/ml Humanserumalbumin (Medical Grade), 18 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methio-
25 nin, pH 5,0 bis 5,2

Formulierung 16: 50 mmol/l Natriumcitrat, 15 mg/ml Humanserumalbumin (Medical Grade), 18 mg/ml Glycerin, pH 5,0 bis 5,2 (Vergleich)

30

Der Gehalt an IFN- β lag bei allen Ansätzen zwischen 10 und 11 MU/ml.

Testdurchführung

Für die Durchführung der Analytik war eine Aufkonzentrierung der Proben notwendig. Zudem mußte bei den Ansätzen 15 und 16 das Humanserumalbumin entfernt werden. Deshalb wurden die Ansätze über eine Anti- β -Chromatographiesäule gegeben. Das Ausgangsvolumen pro Ansatz betrug 32 ml. Die Ansätze 13 bis 16 wurden durch Zugabe von 2,1 ml 0,4 mol/l Na_2HPO_4 und 2,1 ml 0,4 mol/l Na_3PO_4 vor der Anti- β -Chromatographie neutralisiert.

Für die Immunadsorption von Interferon- β an einem monoklonalen Antikörper gegen Interferon- β (B02 Sepharose 6B, cross linked von der Firma Celltech) wurde eine Chromatographiesäule C10 (Firma Pharmacia) mit 5 ml B02-Sepharose gepackt und 3 mal mit je 5-10 Gelvolumina PBS, 0,1 mol/l Natriumphosphat pH 2,0 und PBS/1 mol/l KCl, mit einer linearen Flußrate von 1,0 cm/min gespült.

Der Auftrag von ca. 32 ml der Interferon/HSA haltigen Lösung erfolgte mit einer linearen Flußrate von 0,5 cm/min.

Die Waschung erfolgte mit 10 Gelvolumina PBS/1 mol/l KCl mit einer linearen Flußrate von 1 cm/min bis zum Abfall der OD auf die Grundlinie. Die Elution erfolgte mit ca. 1-2 Gelvolumina 0,1 mol/l Natriumphosphat pH 2,0 mit einer linearen Flußrate von 1 cm/min. Interferon- β wird dabei als einzelner Peak in hoher Reinheit erhalten. Dieses Eluat ist für die sich anschließende Proteincharakterisierung geeignet.

Durchführung der Analytik

1. Lys-C-Mapping

- 5 Mit dem Enzym Endoproteinase Lys-C aus *Achromobacter* (AP) wird Interferon- β unter reduzierenden Bedingungen am C-terminalen Ende von Lysin in 12 Peptide gespalten.

- 10 In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 50 μ l Eluat aus der Anti- β -Chromatographie (12,5-50 μ g Interferon- β) gegeben und mit 5 μ l 2 mol/l TRIS versetzt. Dazu wurde Endoproteinase der Firma Wako in einem Enzym/Substratverhältnis von 1:10 zugegeben (Endoproteinase Lys-C-Lösung in 50 mmol/l TRIS/HCl, pH 9,0). Die Lösung wurde gemischt und bei 30°C 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 5 μ l 0,1 mol/l
15 DTT zum Ansatz.

- Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine Reversed Phase Säule (Vydac C18, 300 Å, 5 μ m, 2,1 mm) an einer HPLC-Anlage HP 1090 M-Serie mit Diodenarraydetektor bei 214 nm, wobei ein Gradient aus A: 0,1% (v/v)
20 TFA und B: 0,1% (v/v) TFA/70% (v/v) Acetonitril verwendet wurde. Die Peptide wurden in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten durchnummeriert und sind folgenden Sequenzen zugeordnet.

SEQ. ID. NO	Peptid	Position	Sequenz
1	AP1	109-115	EDFTRGK
2	AP2	100-105	TVLEEK
3	AP3	46-52	QLQQFQK
4	AP4(ox)	116-123	LM(ox)SSLHLK
5	AP4	116-123	LMSSLHLK
8	AP6(ox)	34-45	DRM(ox)NFDIPEEIK
7	AP5	124-134	RYYGRILHYLK
8	AP6	34-45	DRMNFDIPEEIK
5	AP7	20-33	LLWQLNGRLEYCLK
10	AP8(ox)	1-19	M(ox)SYNLLGFLQRSSNFQCQK
11	AP8	1-19	MSYNLLGFLQRSSNFQCQK
12	AP9	137-166	EYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN
13	AP10(ox)	53-99	EDAALTIYEM(ox)LQNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLK
14	AP10	53-99	EDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLK

Literatur:

Utsumi et al. (1989). Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon- β 1. Eur. J. Biochem. 181, 545-553.

Utsumi et al. (1988): Structural characterization of fibroblast human interferon- β 1. J. Interferon Res. 8, 375-384

Allen, G. (1981): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Sequencing of proteins and peptides. Elsevier Verlag.

Castagnola et al. (1988): HPLC in Protein sequence determinations. J. Chromatography 440, 213-251.

5 In den mit (ox) bezeichneten Peptiden liegt die Aminosäure Methionin als Methioninsulfoxid vor. Die Quantifizierung beruht auf der Bestimmung des Anteils der Peakfläche des oxidierten Peptides zur Gesamtfläche aus intaktem Peptid und oxidiertem Peptid. Die Anteile an oxidierten Methioninen sind in frischen Präparationen von Interferon- β sehr gering. Während der Lagerung nimmt dieser Anteil je nach Lagerbedingungen (Puffer, pH-Wert, 10 Temperatur etc.) mehr oder weniger stark zu. Diese Veränderung ist nicht gewünscht, da sie zur Instabilität des Interferon- β -Moleküls beiträgt bzw. die in vivo Eigenschaften signifikant beeinflussen kann.

15 Der Anteil der oxidierten Peptide AP4(ox), AP6(ox), AP8(ox) und AP10(ox) ist somit ein wichtiges Kriterium zur Bewertung der chemischen Integrität des Interferon- β -Moleküls in einer flüssigen Formulierung.

2. Kohlenhydratbestimmung

20 Im ersten Schritt wurden die Oligosaccharide vom Polypeptid abgetrennt und entsalzt.

25 Etwa 0,7 ml des Eluats der Anti- β -Chromatographie wurden in einem Dialyseschlauch (6 mm Durchmesser Sigma No. D-9277) gegen 500 ml Dialysepuffer (0,05 mol/l Natriumphosphat, 0,10 mol/l NaCl, pH 7,25) unter leichtem Rühren 16-20 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert. Danach wurde der Schlauch an einem Ende aufgeschnitten und der Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestreift. Das Probevolumen betrug nach der Dialyse 1 ml.

30

Zu der dialysierten Probe wurden 20 μ l Tween 20 (10%ig) und 15 μ l N-Glycosidase-F-Lösung (Boehringer Mannheim) pipettiert. Dieses Gemisch

wurde 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurde bei 10.000 U/min 10 min zentrifugiert, über 0,45 µm filtert und anschließend über eine Entsalzungssäule (HR 10/10 Pharmacia No. 17-0591-01) mit einem isokratischen Gradienten (Eluent A: destilliertes Wasser) mit einem Fluß von 1,0 ml/min chromatographiert und fraktioniert. Die Detektion der freien Oligosaccharide erfolgte bei 206 nm.

Im zweiten Schritt wurden die freigesetzten Oligosaccharide über einen Ionenaustauscher aufgetrennt nach der Anzahl ihrer Sialinsäurenreste differenziert.

Die im Eluat der Entsalzungssäule, ca. 2 ml, enthaltenen Oligosaccharide wurden an einen Anionenaustauscher (Mono Q HR 5/5, Pharmacia No. 17-0546-01) gebunden. Die Asialoformen finden sich im Durchlauf. Mit Hilfe eines flachen NaCl-Gradienten eluierten Monosialo-, Disialo- und Trisialoformen in der angegebenen Reihenfolge deutlich getrennt nacheinander.

Eluent A: Milli-Q-Wasser

Eluent B: 0,10 mol/l NaCl

Gradient

0 min	100% A	0% B
5 min	100% A	0% B
25 min	33% A	67% B
26 min	100% A	0% B

Fluß: 0,75 ml/min

Laufzeit: 26 min (mit Regeneration 36 min)

Detektion: UV 206 nm

Die Detektion der einzelnen Oligosaccharidfraktionen erfolgte mittels eines UV-Detektors bei 206 nm. Die quantitative Berechnung wurde über die Integration der Flächen der einzelnen Peaks durchgeführt.

- 5 Die Oligosaccharidfraktionen Monosialo, Disialo und Trisialo wurden anschließend, wie oben beschrieben, über eine Entsalzungssäule geleitet.

Im dritten Schritt werden die geladenen Oligosaccharide in neutrale Oligosaccharide überführt, indem unter sauren pH-Bedingungen die
10 endständigen Sialinsäurenreste hydrolytisch abgespalten wurden.

Dazu wurden von jeder Oligosaccharidfraktion ca. 15 μ l plus 15 μ l Milli Q Wasser in ein Mikroteströhrchen gegeben und 30 μ l 10 mmol/l H_2SO_4 zugefügt. Anschließend wurde 90 min lang auf 80°C erhitzt.

15

Danach wurde 1 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Ansatz in ein Minivial pipettiert. Die jetzt neutralen Kohlenhydrate werden bei alkalischem pH-Wert zu schwachen Anionen und an eine Anionenaustauschersäule (CarboPac PA1 (4x250 mm) P/N 35391, Dionex) gebunden. Die Elution
20 erfolgt mit einem Gradienten aus

Eluent A: NaOH 0,16 mol/l

Eluent B: NaOH 0,16 mol/l Na-Acetat 0,10 mol/l

Eluent C: NaOH 0,16 mol/l Na-Acetat 0,75 mol/l

25

Gradient:

0 min	95% A	5% B	0% C
2,0 min	95% A	5% B	0% C
3,0 min	85% A	15% B	0% C
4,0 min	85% A	15% B	0% C
28,0 min	37% A	63% B	0% C
28,1 min	90% A	0% B	10% C
45,0 min	20% A	0% B	80% C
45,1 min	95% A	5% B	0% C
50,0 min	95% A	5% B	0% C

Fluß: 1,0 ml/min

Laufzeit: 50 min

Detektion: PAD

Zur Bestimmung der Oligosaccharide wird die PAD (Pulsed Amperometric Detection) verwendet. Das Oligosaccharidmolekül wird elektrochemisch oxidiert und der dabei entstehende Strom gemessen. Die PAD zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, so daß ein Nachweis im ng-Bereich ohne Schwierigkeiten möglich ist. Das Ausgangssignal am Detektor (in mV) ist der Menge an Kohlenhydrat direkt proportional. Die Quantifizierung erfolgt über die Integration der Peakflächen.

Die Proben wurden zwischen der Deglykosilierung und der Analyse bei -20°C zwischengelagert.

Literatur:

Townsend (1988): High-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides. Analytical Biochemistry 174, 459-470.

Ergebnisse

1. Lys-C-Mapping

- 5 Das Lys-C-Mapping der Ansätze 11 bis 16 zeigte hinsichtlich der Retentionszeit und der Qualifizierung der Peptide keinen Unterschied zum Ausgangswert.

10 Die Bestimmung des Gehalts von Methioninsulfoxid während der Flüssiglagerung ergab die in den Tabellen 7 (Lagerung für 3 Monate) und 8 (Lagerung für 6 Monate) gezeigten Ergebnisse.

Tabelle 7

Bezeichnung	Anteil AP4ox	Anteil AP6ox	Anteil AP8ox	Anteil AP10ox
15 to-Wert	< 5%	7,6%	LOD	LOD
Formulierung 11	7,9%	10,5%	LOD	LOD
Formulierung 12	< 5%	11,6%	LOD	LOD
Formulierung 13	< 5%	7,3%	LOD	LOD
Formulierung 14	< 5%	9,4%	LOD	LOD
20 Formulierung 15	< 5%	8,6%	LOD	LOD
Formulierung 16	< 5%	10,8%	LOD	LOD

(LOD = nicht nachweisbar)

Tabelle 8

Bezeichnung	Anteil AP4ox	Anteil AP6ox	Anteil AP8ox	Anteil AP10ox
to-Wert	< 5%	7,6%	LOD	LOD
5 Formulierung 10	7,6%	8,9%	LOD	LOD
Formulierung 11	7,7%	9,5%	LOD	LOD
Formulierung 12	12,0%	13,7%	LOD	LOD
Formulierung 13	7,4%	8,7%	LOD	LOD
Formulierung 14	13,7%	15,7%	LOD	LOD
10 Formulierung 15	7,4%	7,9%	LOD	LOD
Formulierung 16	18,0%	17,6%	LOD	LOD

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, daß bei einer dreimonatigen Lagerung die methioninhaltigen Ansätze 13 und 15 gegenüber den methioninfreien Ansätzen einen geringeren Anteil an Methioninsulfoxid zeigen. Nach einer sechsmonatigen Lagerung wird der Einfluß des zugesetzten Methionins in den Ansätzen 11, 13 und 15 deutlicher. Dort ist nur eine sehr geringe Zunahme des Gehalts an Methioninsulfoxid nachweisbar. In den methioninfreien Ansätzen nimmt der Gehalt an Methioninsulfoxid etwas stärker zu, liegt aber in der Summe aller oxidierten Methioninanteile zum Gesamtgehalt an Methionin unter 10%.

2. Kohlenhydratbestimmung

25 In den Tabellen 9a, 9b, 10a, 10b, 11a und 11b sind die Ergebnisse der Kohlenhydratbestimmung nach drei bzw. nach 6 Monaten Lagerzeit angegeben.

Interferon- β -1a besitzt an seiner Aminosäurenkette eine Kohlenhydratstruktur, die sich aus einer definierten Reihenfolge von Monosacchariden aufbaut. Je nach Verzweigungsart spricht man von biantennären (2 Arme), triantennären (3 Arme) und tetraantennären (4 Arme) Strukturen.

5

Die Kohlenhydratstruktur baut sich aus den Monosacchariden Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamin, Galactose und Sialinsäure auf.

Dabei nimmt die Sialinsäure in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein:

- 10 - Sie ist das einzige Monosaccharid mit einer geladenen Gruppe (Carboxylgruppe).
- Sie tritt immer endständig in der Kohlenhydratkette auf.
- Sie ist enzymatisch bzw. hydrolytisch wesentlich leichter abspaltbar als die restlichen Monosaccharide.
- 15 - Während die neutrale Kohlenhydratkette in ihrer Struktur sehr konstant ist, treten beim Anteil der Sialinsäure große Schwankungen auf, die unter anderem von der Zellkultur und dem Aufreinigungsverfahren des Interferons abhängig sind.

20 Literatur:

Kagawa et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 17508-17515; EP-A-0 529 300.

Es wurde der Sialostatus (prozentualer Anteil einzelner Sialostrukturen) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 9a) bzw. sechsmonatiger Lagerung (Tabelle
25 9b) untersucht. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig keine Sialinsäure enthält, wird als Asialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur die endständig eine Sialinsäure enthält, wird als Monosialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig zwei Sialinsäuren enthält, wird als Disialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig drei Sialinsäuren
30 enthält, wird als Trisialo bezeichnet.

Weiterhin wurde die Antennarität (prozentualer Anteil einzelner Verzweigungsarten) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 10a) bzw. nach sechsmonatiger Lagerung (Tabelle 10b) bestimmt. Eine Kohlenhydratstruktur mit einer Verzweigung und damit zwei endständigen Galactosen wird als biantennär bezeichnet. Sie kann terminal mit null bis zwei Sialinsäuren besetzt sein. Eine Kohlenhydratstruktur mit zwei Verzweigungen und damit drei endständigen Galactosen wird als triantennär bezeichnet. Sie kann terminal mit null bis drei Sialinsäuren besetzt sein.

10 Außerdem wurde der Sialylierungsgrad (prozentuale Belegung terminaler Galactosereste mit Sialinsäure) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 11a) bzw. nach sechsmonatiger Lagerung (Tabelle 11b) untersucht.

15 Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß durch die Lagerung bei pH 5 eine geringe, aber reproduzierbare Desialylierung stattfindet. Eine Lagerung bei pH 7 beeinflußt den Sialylierungsgrad nicht.

Der in den Ansätzen 15 und 16 angegebene afuco-Anteil stammt vermutlich von Fremdproteinen aus dem zugesetzten Humanserumalbumin, die durch die Anti- β -Chromatographie nicht quantitativ abgetrennt wurden.

20 Bezüglich der Antennarität erfolgt kein meßbarer Einfluß durch die Flüssiglagerung.

Tabelle 9a

	Bezeichnung	Asialo	Monoasialo	Disialo	Trisialo
	to-Wert	< 3	13,4	73,4	12,1
5	Formulierung 11	< 3	14,0	74,1	11,9
	Formulierung 12	< 3	12,6	74,9	11,6
	Formulierung 13	< 3	16,5	70,4	12,0
	Formulierung 14	< 3	16,6	71,1	11,1
	Formulierung 15	< 3	15,8	70,0	13,0
10	Formulierung 16	< 3	15,1	72,0	11,9

Tabelle 9b

	Bezeichnung	Asialo	Monosialo	Disialo	Trisialo
15	to-Wert	< 3	13,4	73,4	12,1
	Formulierung 10	< 3	13,9	70,2	15,3
	Formulierung 11	< 3	14,5	73,9	11,6
	Formulierung 12	< 3	14,0	72,4	13,6
	Formulierung 13	< 3	18,6	68,9	11,7
20	Formulierung 14	< 3	19,0	69,4	10,7
	Formulierung 15	< 3	17,0	71,0	11,3
	Formulierung 16	< 3	16,1	71,5	12,4

Tabelle 10a

	Bezeichnung	Biantennär	Triantennär 1-> 6	Triantennär + 1 repeat
	to-Wert	74,4	18,1	3,7
5	Formulierung 11	72,9	18,7	3,7
	Formulierung 12	76,9	17,0	2,7
	Formulierung 13	74,7	18,0	3,1
	Formulierung 14	76,9	17,3	2,9
	Formulierung 15	76,2 (inkl. 5% afuco)	18,0	3,3
10	Formulierung 16	76,9 (inkl. 5% afuco)	17,8	3,0

Tabelle 10b

	Bezeichnung	Biantennär	Triantennär 1-> 6	Triantennär + 1 repeat
15	to-Wert	74,4	18,1	3,7
	Formulierung 10	71,4	19,3	4,0
	Formulierung 11	73,0	18,7	3,3
	Formulierung 12	72,3	19,7	3,4
	Formulierung 13	72,4	19,2	3,4
20	Formulierung 14	74,2	18,7	3,2
	Formulierung 15	73,0	18,7	2,8
	Formulierung 16	74,3 (inkl. 4% afuco)	19,7	3,2

Tabelle 11a

	Bezeichnung	Sialylierungsgrad
	to-Wert	88,3
5	Formulierung 11	87,0
	Formulierung 12	88,2
	Formulierung 13	85,8
	Formulierung 14	85,8
	Formulierung 15	86,6
10	Formulierung 16	86,9

Tabelle 11b

	Bezeichnung	Sialylierungsgrad
15	to-Wert	88,3
	Formulierung 10	87,5
	Formulierung 11	86,6
	Formulierung 12	87,7
	Formulierung 13	84,1
20	Formulierung 14	84,3
	Formulierung 15	85,7
	Formulierung 16	86,5

Patentansprüche

1. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- β als Wirkstoff in einer
Konzentration bis zu 25 MU/ml und einen Puffer zur Einstellung eines
pH-Werts von 5 bis 8 enthält, frei von Humanserumalbumin ist und
eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von
mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für
3 Monate aufweist.
2. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- β als Wirkstoff und
einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 6 bis 7,2 enthält, frei
von Humanserumalbumin ist und eine Langzeitstabilität der biologi-
schen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität
nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.
3. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- β als Wirkstoff, einen
Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 und eine oder
mehrere Aminosäuren enthält und eine Langzeitstabilität der biologi-
schen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität
nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.
4. Formulierung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein glykosiliertes Interferon- β enthält.
5. Formulierung nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Interferon- β aus CHO-Zellen stammt.

6. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie den Puffer in einer Konzentration von 10 mmol/l bis 1 mol/l
enthält.
- 5
7. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Puffer ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffern und Mischungen davon enthält.
- 10
8. Formulierung nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Phosphat/Citratpuffer enthält.
- 15
9. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 und 3 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen pH-Wert zwischen 6 und 7,2 aufweist.
- 20
10. Formulierung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie frei von Humanserumalbumin ist.
- 25
11. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie abgesehen vom Wirkstoff frei von humanen oder tierischen
Polypeptiden ist.
- 30
12. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie frei von oberflächenaktiven Verbindungen ist.

13. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine chemische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 6
Monate aufweist.
- 5
14. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine physikalische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 6
Monate aufweist.
- 10
15. Formulierung nach einem der Ansprüche 1, 2 und 4 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin eine oder mehrere Aminosäuren enthält.
- 15
16. Formulierung nach Anspruch 3 oder 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie Methionin enthält.
17. Formulierung nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Methionin in einer Konzentration von 0,1 bis 4 mmol/l
vorliegt.
- 20
18. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin Hilfsstoffe zur Einstellung der Tonizität enthält.
- 25
19. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin Verdickungsmittel zur Viskositätserhöhung enthält.
- 30

20. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin physiologisch verträgliche Konservierungsmittel
enthält.
- 5
21. Pharmazeutisches Präparat,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine flüssige Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 20
enthält.
- 10
22. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 21 zur oralen, parentera-
len oder ophthalmologischen Applikation.
23. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 21 oder 22 mit Einzel-
15 dosen von 1 bis 25 MU.
24. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats nach
einem der Ansprüche 21 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß man eine Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 20 und
gegebenenfalls weitere galenisch notwendige Hilfsstoffe zubereitet
und in eine geeignete Darreichungsform bringt.
- 25
25. Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit einer flüssigen Formulie-
rung, die humanes Interferon- β als Wirkstoff und einen Puffer zur
Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 enthält,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Formulierung ohne Humanserumalbumin oder/und mit
einer oder mehreren Aminosäuren verwendet.
- 30

26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbesserung der Haltbarkeit eine Verbesserung der Langzeit-
stabilität der biologischen Aktivität (in vitro), der chemischen
Integrität oder/und der physikalischen Integrität umfaßt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Dr.Rentschler Biotechnologie GmbH
- (B) STRASSE: Erwin-Rentschler-Str. 21
- (C) ORT: Laupheim
- 10 (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-88471

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Flüssige Interferon-
ß Formulierungen

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- 20 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- 30 (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

(viii) POSITION IM GENOM:

- (B) KARTENPOSITION: 109-115

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

40

Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

45

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- 50 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

55

(viii) POSITION IM GENOM:

- (B) KARTENPOSITION: 100-105

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Thr Val Leu Glu Glu Lys
1 5

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

15

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 46-52

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

20

Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

35

(B) KARTENPOSITION: 116-123

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
 - (B) LAGE: 2
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa = Met(oxi-
- diert) "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

45

Leu Xaa Ser Ser Leu His Leu Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 116-123

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 34-45

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LÄNGE: 3

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa = Met (oxi
diert)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Asp Arg Xaa Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 124-134

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 34-45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 20-33

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 1-19

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE: 1

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa = Met(oxi-
diert) "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Xaa Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

Cys Gln Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 1-19

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

15

Cys Gln Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 137-166

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
1 5 10 15

35

Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 47 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 53-99

50

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LÄNGE: 10

55

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa = Met (oxi-
diert) "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

5 Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Xaa Leu Gln Asn Ile Phe Ala
 1 5 10 15
 Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val
 20 25 30
10 Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys
 35 40 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 47 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:
 (B) KARTENPOSITION: 53-99

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

 Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala
 1 5 10 15
30 Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val
 20 25 30
 Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys
 35 40 45
35

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K38/21 A61K9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 98 28007 A (BIOGEN, INC.) 2 July 1998	1-15, 18, 20, 21, 23-26
Y	see page 3, line 23 - line 32; claims 1-9, 20, 23, 27-35, 41-43; examples 2, 4, 6, 7 see page 12, line 4 - line 8 see page 12, line 10 - page 13, line 7; table 1 see page 16, line 7 - line 12 ---	16, 17, 19, 22
Y	US 5 358 708 A (S.T. PATEL) 25 October 1994 cited in the application see column 2, line 45 - line 57; example 1 see column 3, line 59 - line 66 --- -/--	16, 17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 1999

Date of mailing of the international search report

19/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 529 300 A (BIOFERON BIOCHEMISCHE SUBSTANZEN GMBH & CO) 3 March 1993 cited in the application see claims 1,12,24-26,28; example 3 see page 6, line 6 - line 11 ---	19,22
A	EP 0 374 257 A (TORAY INDUSTRIES, INC.) 27 June 1990 see page 3, line 4 - line 18; claims 1-13 see page 5, line 15 - line 21 see page 14 -----	1-26

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828007	A	02-07-1998	AU 5619198 A	17-07-1998
US 5358708	A	25-10-1994	NONE	
EP 529300	A	03-03-1993	DE 4128319 A	04-03-1993
			AT 172206 T	15-10-1998
			DE 59209525 D	19-11-1998
			ES 2121804 T	16-12-1998
EP 374257	A	27-06-1990	DE 68917883 D	06-10-1994
			DE 68917883 T	23-02-1995
			AT 110571 T	15-09-1994
			WO 8910756 A	16-11-1989
			JP 2803271 B	24-09-1998

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K38/21 A61K9/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 98 28007 A (BIOGEN, INC.) 2. Juli 1998	1-15, 18, 20, 21, 23-26
Y	siehe Seite 3, Zeile 23 - Zeile 32; Ansprüche 1-9, 20, 23, 27-35, 41-43; Beispiele 2, 4, 6, 7 siehe Seite 12, Zeile 4 - Zeile 8 siehe Seite 12, Zeile 10 - Seite 13, Zeile 7; Tabelle 1 siehe Seite 16, Zeile 7 - Zeile 12 ---	16, 17, 19, 22
Y	US 5 358 708 A (S.T. PATEL) 25. Oktober 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 2, Zeile 45 - Zeile 57; Beispiel 1 siehe Spalte 3, Zeile 59 - Zeile 66 ---	16, 17
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 529 300 A (BIOFERON BIOCHEMISCHE SUBSTANZEN GMBH & CO) 3. März 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,12,24-26,28; Beispiel 3 siehe Seite 6, Zeile 6 - Zeile 11 ---	19,22
A	EP 0 374 257 A (TORAY INDUSTRIES, INC.) 27. Juni 1990 siehe Seite 3, Zeile 4 - Zeile 18; Ansprüche 1-13 siehe Seite 5, Zeile 15 - Zeile 21 siehe Seite 14 -----	1-26

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9828007	A	02-07-1998	AU	5619198 A	17-07-1998
US 5358708	A	25-10-1994	KEINE		
EP 529300	A	03-03-1993	DE	4128319 A	04-03-1993
			AT	172206 T	15-10-1998
			DE	59209525 D	19-11-1998
			ES	2121804 T	16-12-1998
EP 374257	A	27-06-1990	DE	68917883 D	06-10-1994
			DE	68917883 T	23-02-1995
			AT	110571 T	15-09-1994
			WO	8910756 A	16-11-1989
			JP	2803271 B	24-09-1998

PCT/EP98/06065

- (51) International Patent Classification⁶: A61K 38/1, 9/08
(11) International Publication No.: WO 99/15193
(43) International Publication Date: 01 April 1999
(21) International File No.: PCT/EP98/06065
(22) International Filing Date: 23 September 1998
(30) Priority Dates: 971165626 23 Sept. 1997
(71) Applicant (*for all destination states except U.S.*): [insert]
(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (*only for U.S.*) [insert]
(74) Attorneys: [insert]
(81) Designation States: [insert]

Published

With international search report.

In case of changes, publication will be repeated prior to expiration of the deadline allowed for changes of the claims.

- (54) Title: **Liquid Interferon- β Formulations**
(57) Abstract: [insert]

Liquid Interferon- β Formulations

Description

The present invention relates to liquid formulations of human interferon- β . These formulations are characterized in that they have a pH value between 5 and 8 in the weakly acidic to neutral range, and they have a high stability of the interferon- β in solution while retaining its molecular integrity.

Naturally occurring interferons are species-specific proteins, in some cases glycoproteins, which are synthesized by various cells in the body after induction with viruses, double-stranded RNA, other polynucleotides and antigens. Interferons have numerous biological activities such as antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties. At least three different types of human interferons have been identified; these interferons, which are produced by leukocytes, lymphocytes, fibroblasts and cells of the immune system, are referred to as α -, β -, and γ -interferons. Individual types of interferons may also be subdivided into various subtypes.

Native human interferon- β can be produced industrially by superinduction of human fibroblast cell cultures with poly-IC and subsequent isolation and purification of interferon β by chromatographic and electrophoretic techniques. Proteins or polypeptides having properties comparable to those of natural interferon- β can also be produced by recombinant DNA technologies (European Patent Application EP-A-0 028 033; European Patent Application EP-A-0 041 313; European Patent Application EP-A-0 070 906; European Patent Application EP-A-0 287 075; Chernajovsky et al. (1984), *DNA*, 3, 297-308; McCormick et al. (1984), *Mol. Cell. Biol.*, 4, 166-172). Recombinant human interferon- β can be produced in both eukaryotic cells (e.g., CHO cells) and prokaryotic cells (e.g., *E. coli*). The corresponding interferons are known as interferon- β -1a and interferon- β -1b. In contrast with interferon- β -1b, interferon- β -1a is glycosylated (Goodkin (1994), *Lancet*, 344, 1057-1060).

Therapeutic use of interferon- β presupposes that it is converted to a pharmaceutical preparation which permits storage of the protein for a long period of time while maintaining its molecular integrity. Interferon- β is unstable and is subject to various degradation reactions, including in particular, cleavage of peptide bonds, deamidation, oxidation of methionine to methionine sulfide, disulfide exchange and changes in the sugar side chains up to and including deglycosylation.

On the basis of the therapeutic benefit of interferons, a number of formulations have been developed in past years, but they all had certain disadvantages. U.S. Patent No. 4,647,454 (Inter Yeda Ltd.) describes a formulation of fibroblast interferon- β which can be stabilized by adding polyvinyl pyrrolidone (PVP) in the strongly acidic range (pH 3.5). Other preferred additives include mannitol, human serum albumin and acetate buffer. The formulation is freeze-dried and stored at 4 °C.

Japanese Patent 59 181 224 (Sumitomo Chemical Co.) describes an aqueous solution of interferons in which polar amino acids such as arginine, asparagine, glutamic acid, glutamine, histidine, lysine, serine and threonine or their sodium salts are used together with human serum albumin to stabilize the interferons.

International Patent Application WO 95/31213 (Applied Research Systems ARS Holding) describes a liquid formulation for interferon- β , which is stabilized by adding a polyol, preferably mannitol, and a non-reducing sugar or an amino acid. The formulation also contains a buffer (acetate buffer, pH 3.0 to 4.0) as well as human serum albumin. Although formulations having a pH value between 5 and 6 have shown an immediate loss of biological activity, the formulations preferred in this patent publication have sufficient stability at a pH value of 3.0 or 4.0. In this case, the stability is evaluated on the basis of the biological activity of the formulation but not the molecular integrity of the active ingredient.

European Patent Application EP 0 215 658 (Cetus Corp.) describes a formulation for recombinant interferon- β in which the biologically active compound is dissolved in an aqueous medium at a pH between 2 and 4 with the addition of stabilizers such as human serum albumin or human plasma protein fractions and optionally dextrose. Another patent application by Cetus Corp. (International Patent WO 89/05158) describes an interferon- β formulation which has a pH between 2 and 4 and uses as stabilizers either glycerol or polyethylene glycol polymers with an average molecular weight between 190 and 1600 daltons. Suitable buffer components include glycine, phosphoric acid and citric acid.

European Patent EP 0 217 645 (Cetus Corp.) describes pharmaceutical preparations containing IL-2 or interferon- β which are dissolved in a carrier medium at a pH of 7 to 8 and are stabilized with the addition of sodium laurate as the surface-active compound. In addition, SDS is also needed as an additional ionic surfactant compound to stabilize these preparations.

European Patent EP 0 270 799 (Cetus Oncology Corp.) describes a formulation for nonglycosylated recombinant interferon- β in an inert carrier medium based on water, containing nonionic polymer detergents as stabilizers.

European Patent Application EP 0 529 300 (Rentschler Biotechnologie GmbH) describes liquid interferon- β formulations which contain recombinant IFN- β in a concentration of 30 or 70 MU/mL plus sodium chloride and imidazole or sodium phosphate buffer at a pH of 7.5 (Example 3). These formulations are stable for four weeks at a storage temperature of 25 °C with respect to their biological activity. However, these combinations have the disadvantage that the concentration of interferon- β used in them (≥ 30 MU/mL) is too high for practical applications. In addition, there is no mention in European Patent Application EP-A 0 529 300 that the stability of liquid interferon- β formulations is reduced by the addition of human serum albumin. On the contrary, the addition of human serum albumin is mentioned as preferred.

In addition to formulations of interferon- β , pharmaceutical forms of administration containing interferon- γ have also been described. European Patent 0 082 481 (Schering Corp.) discloses an aqueous formulation intended for freeze drying which contains human serum albumin in addition to a phosphate buffer. Alanine is mentioned as another optional ingredient. The pH value of the solution after reconstitution is between 7.0 and 7.4. Another patent application by Schering Corp. (International Patent WO 96/11018) discloses stable aqueous solutions of interferon- α which contain (at a pH between 4.5 and 7.1) chelating agents (NaEDTA or citric acid), a surfactant compound (polysorbate 80), an isotonicizing agent (sodium chloride) as well as suitable preservatives such as methylparaben, propylparaben, *m*-cresol or phenol. The aqueous formulations disclosed there have proven to be stable (biological activity > 90% of the starting activity) with regard to their biological activity for six months at 25 °C (standard method of inhibition of the cytopathic effect (CPE) of a virus as described by W. P. Protzman in *J. Clinical Microbiology*, 1985, 22, pp. 596-599). However, a parallel determination of the protein content by HPLC shows a decline in content amounting to between 20.2 % (Table 3) and 32.5 % (Table 4) after only six months at 25 °C.

European Patent Application EP-A 0 736 303 (Hoffmann LaRoche AG) discloses aqueous interferon- γ compositions which contain, in addition to an interferon- α , a nonionic detergent, a buffer for adjusting the pH value to a range between 4.5 and 5.5, benzyl alcohol and an optional isotonicizing agent. With an initial concentration of 18 MU interferon- α Z2e, a residual interferon content of 84.5 % is found in a determination by means of HPLC after three months of storage at 25 °C, but this value drops to 62.8 % when benzyl alcohol is omitted as the stabilizer.

European Patent Application EP-A 0 641 567 (Ciba Geigy AG) describes pharmaceutical compositions containing hybrid interferon- α and, as the stabilizer, a buffer at a pH between 3.0 and 5.0.

U.S. Patent 5,358,708 (Schering Corp.) describes aqueous formulations of interferon- α containing as the stabilizer methionine, histidine or mixtures thereof. After two weeks of storage of an interferon- α solution at 40 °C, a 20 % drop in the active ingredient content is found.

According to the prevailing standpoint today, the formulations of interferons listed above have numerous disadvantages, because the addition of human serum albumin should now be avoided for stabilization of proteins because of increased demands regarding safety from viral contamination due to blood donors. In addition, for a number of the formulations described above, it is also necessary to add amino acids and/or to perform freeze-drying. However, freeze-dried products are very complicated to manufacture and are expensive accordingly, and they require an additional step due to the need for reconstitution; however, this is often difficult to do for patients with restricted motor capacity. A number of formulations have a non-physiological pH value of less than 5.0. Although such values are not completely unconventional (see also S. Sweetans and N. J. Aders, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology*, 1996, 50:330-342), painful irritation must be expected when these preparations are administered intramuscularly or subcutaneously. Although it is admissible to use surfactant compounds such as polysorbate 80 (according to Sweetana and Akers), however, a number of side effects have been described, especially in children

and neonates, casting doubt on the use of such additives. The toxicity of surfactant compounds is reported in a summary form by Attwood and Florence (*Surfactant Systems, Their Chemistry, Pharmacy and Biology*, Chapman and Hall; London, 1983). A review of the pharmacology of polysorbate 80 can be found in R. K. Varma et al. (*Arzneim.-Forsch./Drug Research*, 35, 1985, 804-808).

Because of the disadvantages mentioned above, an optimum formulation for interferon- β should combine the following properties:

- Preserving the biological activity over the entire storage period,
- Preserving the molecular integrity of the active ingredient molecule over the entire storage period,
- Liquid formulation, no expensive freeze drying or additional reconstitution,
- Avoiding high-risk additives such as human serum albumin or surfactant compounds (detergents),
- pH value in the neutral to weakly acidic range.

All requirements are met by the present invention, which is described in greater detail in the following section.

Surprising, a formulation has been discovered which ensures the molecular integrity of interferon- β in liquid form over a long period of time in a physiological pH range between 5 and 8, preferably from 5.5 to 8 without having to rely on the known additives of the state of the art.

Another aspect of the present invention is therefore a liquid pharmaceutical formulation which contains human interferon- β as an active ingredient in a concentration of up to 25 MU/mL and a buffer to establish a certain pH value, preferably between greater than 5.5 and 8, is free of human serum albumin, and has a long term stability of the biological activity (*in vitro*) of at least 80 % of the initial activity after storage for three months at 25 °C.

Another aspect of this invention is a liquid pharmaceutical formulation which contains human interferon- β as the active ingredient and a buffer for adjusting the pH to a value between 6 and 7.2, is free of human serum albumin and has a long term stability of the biological activity (*in vitro*) of at least 80 % of the initial activity after storage for three months at 25 °C.

Yet another aspect of this invention is a liquid pharmaceutical formulation which contains human IFN- β as the active ingredient, a buffer for adjusting a pH between 5 and 8, preferably between greater than 5.5 and 8, contains one or more amino acids and has a long term stability of the biological activity (*in vitro*) of at least 80 % of the initial activity after storage for three months at 25 °C.

The long-term stability of liquid pharmaceutical formulations was measured at 25 °C. A temperature of 25 °C was selected to accelerate degradation reactions on the one hand while on the other hand not causing any artefacts to be formed due to excessive temperatures. Suitable analytical methods for determining the stability of interferon data are described in the review article by J. Geigert (*J. Parent. Sci. Technol.* 43 (1989) 220-224) or M. C. Manning, K. Patel and R. T. Borchardt (*Pharm. Res.* 6 (1989), 903-918).

The biological activity was measured after the specified storage period by the standard method of inhibition of the cytopathic effect of a virus. A precise description of the test method used can be found in W. E. Stewart II (1981): *The Interferon System* (second enlarged edition), Springer Verlag, Vienna, New York; S. E. Grossberg et al. (1984), "Assay of Interferons," in: P. E. Came, W. A. Carter (eds.), *Interferons and Their Applications*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43. After three months of storage at 25 °C, a formulation according to this invention will have a biological activity of at least 80 %, preferably at least 85 %, and especially preferably at least 90 % of the initial activity.

A formulation according to this invention will preferably have a biological activity of at least 80 % and preferably at least 85 % of the initial activity after storage for six months at 25 °C.

Even in the case of storage at a higher temperature, such as 37 °C, the formulations according to this invention have a surprisingly high long-term stability of the biological activity. Thus, after storage for one month at 37 °C, a biological activity of at least 70 % and preferably at least 80 % of the initial activity was found.

The liquid pharmaceutical formulations according to this invention are preferably free of human serum albumin and especially preferably free of human or animal polypeptides (apart from the active ingredient), especially serum proteins. In addition, it is preferable for the liquid pharmaceutical formulation according to this invention to be free of surfactant agents, and in particular free of ionic detergents and/or nonionic surfactants.

The formulations according to this invention contain as the active ingredient an interferon- β , i.e., a polypeptide which has the biological and/or immunological properties of natural human interferon- β and may be a naturally occurring or recombinant interferon- β . The formulation preferably contains a glycosylated interferon- β , especially preferably a recombinant interferon- β from CHO cells. The most preferred are interferon- β species such as those obtained from the cell line BiC 8622 (ECACC 87 04 03 01) and described in European Patent EP-B-0 287 075 and European Patent Application EP-A-0 529 300, for example.

The active ingredient is preferably present in the formulations according to this invention in a concentration of up to 25 MU/mL. However, a dosage in the range of 1 to 25 MU/mL is preferred, especially preferably from 3 to 20 MU/mL and most preferably from 3 to 10 MU/mL. These dosage ranges allow direct use without further dilution plus an especially good stability at elevated temperatures. Another preferred feature of the liquid pharmaceutical formulation according to this invention is that it has chemical integrity after storage at 25 °C for three months and preferably for six months, i.e., it is stable with respect to peptide cleavage, oxidation and deglycosylation. The chemical integrity is measured by peptide mapping, Western Blot and glycosylation analysis. Compositions in which the interferon- β retains at least 85 %, preferably at least 90 % of its chemical integrity under the selected storage conditions are considered to be chemically stable in conjunction with the present invention.

Another preferred feature of the liquid pharmaceutical formulations according to this invention is their physical integrity after storage for three months at 25 °C and preferably for six months. The physical

integrity is measured by measuring the transmittance at 420 nm and by visual observation of the solutions. The solutions which are physically stable are those whose transmittance is more than 90 %, preferably more than 93 % under the selected storage conditions and in which no turbidity can be detected by visual observation.

Surprisingly, liquid formulations of interferon- β which are biologically, chemically and physically stable over a long period of time and are free of unwanted ingredients such as human serum albumin or surfactant agents can be made available through the present invention. The formulations according to this invention contain, in addition to the active ingredient, a buffer which is preferably present in a concentration of 10 mmol/L to 1 mol/L, especially preferably in a concentration of 20 mmol/L to 200 mmol/L, e.g., approx. 50 mmol/L to 100 mmol/L, and which serves to keep the pH of the formulation in the range of 5 to 8, preferably from more than 5.5 to 8 and even more preferably between 6 and 7.4. A pH between 6 and 7.2 is especially preferred, and a pH between 6.2 and 6.8 is most preferred, because this is where an especially high stability is achieved while maintaining molecular integrity. The buffer is selected from pharmaceutically acceptable buffers such as borate, succinate, L-malate, Tris, salicylate, glycylglycine, triethanolamine, isocitrate, maleate, phosphate, citrate and acetate buffers or mixtures thereof. The preferred buffers are phosphate, citrate and acetate buffers or mixtures thereof, especially preferably phosphate/citrate buffer.

In addition to the active ingredient and the buffer, the formulation according to this invention may also contain other physiologically safe additives such as additives to adapt the tonicity to that of blood or tissue, such as non-reducing sugars, sugar alcohols such as mannitol, sorbitol, xylitol or glycerol. In addition, one or more amino acids such as alanine, arginine, glycine, histidine and/or methionine may be added to the formulation according to this invention to further increase its chemical stability. Methionine is preferred here. The methionine concentration is preferably in the range of 0.1 to 4 mmol/L. A concentration of 2 mmol/L is especially preferred. In addition, the formulation may contain thickeners to increase the viscosity, e.g., for ophthalmological applications. Examples of suitable thickeners include ophthalmologically suitable polymers such as carbopol, methylcellulose, carboxymethylcellulose, etc. In addition, the composition according to this invention may also contain preservatives. For ophthalmological purposes, thiomersal, for example, may be used in an amount of 0.001 % to 0.004 % (weight/volume).

In addition, this invention also relates to pharmaceutical preparations which contain a liquid formulation of interferon- β as described above. These pharmaceutical preparations are especially suitable for oral, parenteral or ophthalmological application. These formulations are preferably prepared in single doses of 1 to 25 MU IFN- β . In addition, this invention also relates to a method of producing such pharmaceutical preparations, wherein a formulation according to this invention plus optionally other necessary pharmaceutically additives is prepared and converted to a suitable form of administration.

The formulation according to this invention can be stored in suitable washed and sterilized glass vials (hydrolytic class 1) with pharmaceutically acceptable rubber stoppers.

In addition, formulations according to this invention may also be packaged aseptically in ready-to-use syringes or in cartridge ampoules for use in self-injection systems. The aqueous solutions may be freeze

dried (although this is not preferred) by adding other additives with which those skilled in the art are familiar, and are then available in liquid form after being reconstituted.

Liquid multiple dosage forms and eyedrop solutions and drop solutions for oral administration may be prepared by adding suitable preservatives.

The additional additives needed for production of the corresponding forms of administration are familiar to those skilled in the art.

Finally, this invention relates to a method of improving the stability of the liquid formulation which contains human interferon- β as the active ingredient and a buffer for adjusting the pH value in the range of 5 to 8, preferably from greater than 5.5 to 8, characterized in that a formulation without human serum albumin and/or with one or more amino acids is used. The improvement in stability includes an improvement in the long-term stability of the biological activity (*in vitro*), the chemical integrity and/or the physical integrity as described above.

In addition, this invention is illustrated by the following examples.

Examples

An interferon- β obtained from CHO cells was used in all the examples.

1. Long-term stability of liquid interferon- β formulations at 25 °C

The following formulations were tested:

Formulation 1: 50 mmol/L sodium citrate, pH 5.0

Formulation 2: 50 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0, 15 mg/mL human serum albumin, 2 mmol/L methionine, 50 mg/mL glycerol

Formulation 3: 50 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0, 50 mg/mL glycerol, 2 mmol methionine

Formulation 4: 50 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0, 2 mmol/L methionine

Formulation 5: 50 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0

Formulation 17: 70 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, 2 mmol/L methionine, pH 6.5

The formulations were diluted to a content of approx. 10 to 15 MU/mL (i.e., 10 to 15 $\times 10^6$ IU/mL).

With the exception of formula 17 (see below), the formulations were placed in glass vials of hydrolytic class 1 (DIN 2R vials) which were sealed with conventional chlorobutyl rubber stoppers and stored at 25 °C for the stated period of time. The biological activity (*in vitro*) was determined by the method described by W. E. Stewart II (1981): *The Interferon System* (second enlarged edition), Springer Verlag: Vienna New York; S. E. Grossberg et al. (1984), "Assay of Interferons," in: P. E. Came, W. A. Carter (eds.), *Interferons and their Applications*, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43.

The results are shown in Tables 1 through 5. The notation "% (Ref)" refers to the relative biological activity based on the biological activity of a reference specimen for the stated period of time at -20°C . The notation "% (0Mo)" refers to the percentage biological activity based on the initial value at 0 months.

Table 1 (Formulation 1):

Months	Active ingredient content			
			Recovery (25 °C)	
	-20 °C	25 °C	% (Ref)	% (0 Mo)
0	11.0	11.0	100	100
1	10.0	9.8	98	89
2	9.7	11.0	113	100
3	10.0	10.6	106	96
4	10.3	9.5	92	86
5	9.5	9.7	102	88
6	10.5	10.2	97	93

Table 2 (Formulation 2):

Months	Active ingredient content			
			Recovery (25°C)	
	-20 °C	25 °C	% (Ref)	% (0 Mo)
0	13.9	13.9	100	100
1	14.0	11.9	85	86
2	13.0	11.6	89	83
3	13.1	9.6	73	69
4	12.5	8.8	70	63
5	11.0	8.2	75	59
6	13.3	8.4	63	60

Table 3 (Formulation 3):

Months	Active ingredient content			
			Recovery (25 °C)	
	-20 °C	25 °C	% (Ref)	% (0 Mo)
0	12.5	12.5	100	100
1	9.4	10.0	106	80
2	8.3	11.5	139	92
3	7.8	11.8	151	94.4
4	6.8	10.3	151	82.4
5	6.6	11.2	170	89.6
6	7.8	13.4	172	107.2

Table 4 (Formulation 4):

Months	Active ingredient content			
			Recovery (25 °C)	
	-20 °C	25 °C	% (Ref)	% (0 Mo)
0	11.4	11.4	100	100
1	10.5	10.2	97	89
2	11.9	11.1	93	97
3	10.8	10.0	93	88
4	10.4	9.3	89	82
5	11.6	8.4	72	74
6	12.4	9.5	77	83

Table 5 (Formulation 5):

Months	Active ingredient content			
			Recovery (25 °C)	
	-20 °C	25 °C	% (Ref)	% (0 Mo)
0	11.3	11.3	100	100
1	11.0	9.7	88	86
2	11.7	10.1	86	89
3	11.1	10.2	92	90
4	11.3	10.2	90	90
5	12.0	9.2	77	81
6	11.0	9.7	88	66

It can be seen from the above tables that formulations which do not contain any human serum albumin (formulations 1, 3, 4 and 5) surprisingly have a better stability than a formulation (formulation 2) which contains human serum albumin.

In the case of formulation 17 (see above), an interferon solution without human serum albumin was adjusted to an activity of 6 MU/0.5 mL under aseptic conditions. The clear, colorless solution was then filtered under sterile conditions and packaged in 0.5 mL amounts in pre-sterilized disposable syringes and sealed. The ready-to-use syringes were stored at 25 °C and were tested for clarity, pH and biological activity, yielding the following results:

Storage in months	pH	Clarity (%)	MU/syringe		Recovery (25 °C)	
			-20 °C	25 °C	% (Ref)	% (0 Mo)
0	6.5	99.5	6.3	6.3	100	100
3	6.5	99.1	5.6	6.1	108	97

2. Long term stability of liquid IFN- β formulations at 37 °C

The following formulations were tested in ready-to-use syringes:

Formulation 6: 50 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0, 2 mmol/L methionine

Formulation 7: 50 mmol/L sodium citrate, pH 5.0, 18 mg/mL glycerol, 2 mmol/L methionine

Formulation 8: 50 mmol/L sodium citrate, pH 5.0, 18 mg/mL glycerol, 15 mg/mL human serum albumin, 2 mmol/L methionine

Formulation 9: 50 mmol/L sodium citrate, pH 6.0, 18 mg/mL glycerol, 2 mmol/L methionine

Formulation 10: 50 mmol/L sodium citrate, pH 6.5, 18 mg/mL glycerol, 2 mmol/L methionine
 The formulations were tested in dosages of 3 MU per 0.5 mL (dosage strength 3), 6 MU per 0.5 mL (dosage strength 6) and 12 MU per mL (dosage strength 12).
 The results are shown in the following Table 6.

Table 6.

Storage in months	Dosage strength 3					Dosage strength 6					Dosage strength 12				
	Formulation					Formulation					Formulation				
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	71	80	61	74	69	72	85	63	86	84	87	88	71	76	84
2	51	82	33	74	85	51	81	43	80	76	69	68	48	77	81
3	44	76	23	63	65	48	64	36	73	69	66	72	35	80	81
4	33	51	16	51	61	46	65	26	84	--	--	64	24	78	79

The results in Table 6 show that the formulations according to this invention without human serum albumin surprisingly have an improved stability at 37 °C.

3. Chemical stability at 25 °C

To investigate the chemical stability of liquid formulations of IFN- β , seven batches were formulated and stored at 25 °C. After storage for three months and six months, the protein was characterized by means of Lys-C mapping and a complete carbohydrate analysis. Special attention was devoted to the formation of methionine sulfoxide and to desialylation.

In addition to formulation 10 (see above), the following formulations were tested:

- Formulation 11: 50 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, 2 mmol/L methionine, pH 7.0 to 7.2
- Formulation 12: 50 mmol/L sodium citrate, 50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0 to 7.2
- Formulation 13: 50 mmol/L sodium citrate, 18 mg/mL glycerol, 2 mmol/L methionine, pH 5.0 to 5.2
- Formulation 14: 50 mmol/L sodium citrate, 18 mg/mL glycerol, pH 5.0 to 5.2
- Formulation 15: 50 mmol/L sodium citrate, 15 mg/mL human serum albumin (medical grade), 18 mg/mL glycerol, 2 mmol/L methionine, pH 5.0 to 5.2
- Formulation 16: 50 mmol/L sodium citrate, 15 mg/mL human serum albumin (medical grade), 18 mg/mL glycerol, pH 5.0 to 5.2 (comparison)

In all batches, the IFN- β content was between 10 and 11 MU/mL.

Test procedure

To perform the analysis, it was necessary to increase the concentration of the specimens. In addition, in the case of batches 15 and 16, the human serum albumin had to be removed. Therefore, the batches were applied to an anti- β chromatography column. The starting volume per batch was 32 mL. Batches 13 to 16 were neutralized by adding 2.1 mL 0.4 mol/L Na_2HPO_4 and 2.1 mL 0.4 mol/L Na_2PO_4 before performing anti- β chromatography.

For the immunoabsorption of interferon- β on a monoclonal antibody to interferon- β (BO2 Sepharose 6B, crosslinked, from Celltech), a C10 chromatography column (Pharmacia) was packed with 5 mL BO2 Sepharose and rinsed three times with, each time, 5-10 gel volumes of PBS, 0.1 mol/L sodium phosphate, pH 2.0 and PBS/1 mol/L KCl at a linear flow rate of 1.0 cm/min.

Approx. 32 mL of the solution containing interferon/HSA was applied at a linear flow rate of 0.5 cm/min. The column was washed with 10 gel volumes of PBS/1 mol/L KCl at a linear flow rate of 1 cm/min until the OD dropped to the base line. Elution was performed with approx. 1-2 gel volumes of 0.1 mol/L sodium phosphate, pH 2, at a linear flow rate of 1 cm/min. Interferon- β was obtained as a single peak in a high purity. This eluate was suitable for the subsequent protein characterization.

Performing the analysis

1. Lys-C mapping

With the endoproteinase enzyme Lys-C from *Achromobacter* (AP), interferon- β was split into 12 peptides at the C-terminal end of lysine under reducing conditions.

Fifty μL eluate from anti- β chromatography (12.5-50 γg interferon- β) was placed in an Eppendorf reaction vessel and mixed with 5 μL 2 mol/L Tris. To this was added endoproteinase from the Wako company in an enzyme/substrate ratio of 1:10 (endoproteinase-Lys-C solution in 50 mmol/L Tris/HCl, pH 9.0). The solution was mixed and incubated for two hours at 30 $^{\circ}\text{C}$. Then 5 μL of 0.1 mol/L DTT was added to the batch.

The peptides were separated on a reversed phase column (Vydac C18, 300 \AA , 5 μm , 2.1 mm) using an HP 1090 M series HPLC system with a diode array detector at 214 nm [sic; nm], using a gradient of A: 0.1% (v/v) TFA and B: 0.1 (v/v) TFA/70% (v/v) acetonitrile. The peptides were numbered consecutively in the order of their retention times and were assigned to the following sequences.

Sequence ID No.	Peptide	Position	Sequence
1	AP1	109-115	EDFTRGK
2	AP2	100-105	TVLEEK
3	AP3	46-52	QLQQFQK
4	AP4(ox)	116-123	LM(ox)SSLHLK
5	AP4	116-123	LMSSLHLK
6	AP6(ox)	34-45	DRM(ox)NFDIPEEIK
7	AP5	124-134	RYYGRILHYLK
8	AP6	34-45	DRMNFDIPEEIK
9	AP7	20-33	LLWQLNGRLEYCLK
10	AP8(ox)	1-19	M(ox)SYNLLGFLQRSSNFQCQK
11	AP8	1-19	MSYNLLGFLORSSNFODQK
12	AP9	137-166	EYSHCAWTIVRVEILRNFYRNRLTGYLAN
13	AP10(ox)	53-99	EDAALTIYEM(ox)LQNIFAIFRQDSSS

			TGWENETIVENLLANVYHQINHLK
14	AP10	53-99	EDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLK

Literature:

Utsumi et al. (1989). Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon- β 1. *Eur. J. Biochem.* 181, 545-553.

Utsumi et al. (1988): Structural characterization of fibroblast human interferon- β 1. *J. Interferon Res.* 8, 375-384.

Allen, G (1981): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Sequencing of Proteins and Peptides*. Elsevier Verlag.

Castagnola et al. (1988). HPLC in protein sequence determinations. *J. Chromatography* 440, 213-251.

In the peptides designated as (ox), the amino acid methionine is present in the form of methionine sulfoxide. The quantification is based on the determination of the amount of the peak area of the oxidized peptide relative to the total area of the intact peptide and the oxidized peptide. The amounts of oxidized methionines are very low in fresh preparations of interferon- β . During storage, this amount increases to varying extents, depending on the storage conditions (buffer, pH, temperature, etc.). This change is not desirable, because it can contribute to the instability of the interferon- β molecule and it can have a significant influence on the *in vivo* properties.

The amount of oxidized peptides AP4(ox), AP6 (ox), AP8(ox) and AP10(ox) is thus an important criterion for evaluating the chemical integrity of the interferon- β molecule in a liquid formulation.

2. Carbohydrate determination

In the first step, the oligosaccharides were separated from the polypeptide and desalinated.

Approx. 0.7 mL of the eluate from anti- β chromatography was dialyzed against 500 mL dialysis buffer (0.05 mol/L sodium phosphate, 0.10 mol/L NaCl, pH 7.25) for 16 to 20 hours at room temperature while stirring lightly in a dialysis tube (6 mm diameter, Sigma No. D-9277). Then the tube was cut open at one end, and the contents were stripped into an Eppendorf reaction vessel. After dialysis, the volume of the specimen was 1 mL.

To the dialyzed specimen were added 20 μ L Tween 20 (10%) and 15 μ L N-glycosidase F solution (Boehringer Mannheim) by pipette. This mixture was incubated for hours at 37 °C. After conclusion of the incubation, the mixture was centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm, filtered through a 0.45 μ m

filter and then chromatographed and fractionated over a desalination column (HR 10/10 Pharmacia No. 17-0591-01) with an isocratic gradient (eluent A: distilled water) at a flow rate of 1.0 mL/min. The free oligosaccharides were detected at 206 nm.

In the second step, the oligosaccharides thus released were separated on an ion exchanger and differentiated according to the number of sialic acid groups.

The oligosaccharides contained in the eluate of the desalination column (approx. 2 mL) were bound to an anion exchanger (Mono Q HR 5/5, Pharmacia No. 17-0546-01). The asialo forms are found in the eluate. Monosialo, disialo and trisialo forms eluted with the help of a shallow NaCl gradient are found definitely separated one after the other in the order given here.

Eluent A: Milli-Q water

Eluent B: 0.10 mol/L NaCl

Gradient:

0 min	100 % A	0 % B
5 min	100 % A	0 % B
25 min	33 % A	67 % B
26 min	100 % A	0 % B

Flow rate: 0.75 mL/min

Running time: 26 min (with regeneration 36 min)

Detection: UV 206 nm

Detection of the individual oligosaccharide fractions was performed by means of a UV detector at 206 nm. The quantitative calculation was performed by integration of the areas of the individual peaks.

The monosialo, disialo and trisialo oligosaccharides were then passed through a desalination column as described above.

Then in the third step, the charged oligosaccharides were converted to neutral oligosaccharides by hydrolytic cleavage of the terminal sialic acid groups under acidic pH conditions.

To do so, approx. 15 µL of each oligosaccharide fraction and 15 µL Milli-Q water were placed in a micro test tube, and 30 µL 10 mmol/L H₂SO₄ was added. Then the mixture was heated to 80 °C for 90 minutes.

Next, the test tube was centrifuged at 5000 rpm for one minute, and the batch was pipetted into a mini-vial. The carbohydrates, which were then neutral, were bound to weak anions and to an anion exchange column (CarboPac PA1 (4 × 250 mm) P/N 35391, Dionex) at an alkaline pH. Elution was performed with a gradient as follows:

Eluent A: NaOH 0.15 mol/L

Eluent B: NaOH 0.15 mol/L sodium acetate 0.10 mol/L

Eluent C: NaOH 0.15 mol/L sodium acetate 0.75 mol/L

Gradient:

0 min	95 % A	5 % B	0 % C
2.0 min	95 % A	5 % B	0 % C
3.0 min	85 % A	15 % B	0 % C
4.0 min	85 % A	15 % B	0 % C
28.0 min	37 % A	63 % B	0 % C
28.1 min	90 % A	0 % B	10 % C
45.0 min	20 % A	0 % B	80 % C
45.1 min	95 % A	5 % B	0 % C
50.0 min	95 % A	5 % B	0 % C

Flow rate: 1.0 mL/min

Running time: 50 min

Detection: PAD

PAD (pulsed amperometric detection) was used to determine the oligosaccharides. In this method, the oligosaccharide molecule is oxidized electrochemically and the resulting electric current is measured. PAD is an extremely sensitive method which permits detection in the ng range with no problem. The starting signal on the detector (in mV) is directly proportional to the carbohydrate content. Quantification is based on integration of the peak areas.

The specimens were stored temporarily at -20°C between deglycosylation and analysis.

Literature

Townsend (1988): High performance anion exchange chromatography of oligosaccharides. *Analytical Biochemistry* 174, 459-470.

Results

1. Lys-C mapping

Lys-C mapping of batches 11 through 16 did not reveal any difference in comparison with the initial value with regard to the retention time or qualification [sic; quantification] of the peptides.

Determination of the methionine sulfoxide content during liquid storage yielded the results shown in Table 7 (storage for three months) and Table 8 (storage for six months).

Table 7

Identification	Amount of AP4ox	Amount of AP6ox	Amount of AP8ox	Amount of AP10ox
t ₀ value	< 5 %	7.6 %	LOD	LOD
Formulation 11	7.3 %	10.5 %	LOD	LOD
Formulation 12	< 5 %	11.6 %	LOD	LOD
Formulation 13	< 5 %	7.3 %	LOD	LOD
Formulation 14	< 5 %	9.4 %	LOD	LOD
Formulation 15	< 5 %	8.6 %	LOD	LOD
Formulation 16	< 5 %	10.8 %	LOD	LOD

(LOD = not detectable)

Table 8

Identification	Amount of AP4ox	Amount of AP6ox	Amount of AP8ox	Amount of AP10ox
t ₀ value	< 5 %	7.6 %	LOD	LOD
Formulation 10	7.6 %	8.9 %	LOD	LOD
Formulation 11	7.7 %	9.6 %	LOD	LOD
Formulation 12	12.0 %	13.7 %	LOD	LOD
Formulation 13	7.4 %	8.7 %	LOD	LOD
Formulation 14	13.7 %	15.7 %	LOD	LOD
Formulation 15	7.4 %	7.9 %	LOD	LOD
Formulation 16	18.0 %	17.0 %	LOD	LOD

It can be seen from Table 7 that after three months of storage, batches 13 and 15, which contain methionine, have a lower methionine sulfoxide content in comparison with the methionine-free batches. After six months of storage, the influence of the added methionine in batches 11, 13 and 15 is more apparent. Only a very slight increase in methionine sulfoxide content can be detected there. The methionine sulfoxide content increases somewhat more in the batches that do not contain any methionine initially, but it remains less than 10 % in the sum of all the oxidized methionine contents relative to the total methionine content.

2. Carbohydrate determination

Tables 9a, 9b, 10a, 10b, 11a and 11b show the results of the carbohydrate determinations after three months of storage and after six months of storage.

On its amino acid chain, interferon- β -1a has a carbohydrate structure which is composed of a defined sequence of monosaccharides. Depending on the type of branching, these are called biantennary structures (having two arms), triantennary structures (three arms) and tetraantennary structures (four arms).

The carbohydrate structure is composed of the monosaccharides mannose, fucose, N-acetylglucosamine, galactose and sialic acid.

Sialic acid is in a special position in several regards:

- It is the only monosaccharide having a charged group (carboxyl group).
- It always occurs in the terminal position and the carbohydrate chain.
- It is split off much more easily by enzymes or by hydrolysis than the other monosaccharides.

- Although the structure of the neutral carbohydrate chain is very constant, there are great variations in the amount of sialic acid, depending on the cell structure and the interferon purification method, among other things.

Literature:

Kagawa et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 17508-17515; European Patent EP-A-0 529 300.

The sialo status (percentage amount of individual sialo structures) was investigated after three months of storage (Table 9a) and after six months of storage (Table 9b). A carbohydrate structure which does not have any sialic acid in terminal position is known as an asialo. A carbohydrate structure having one sialic acid group in terminal position is a monosialo. A carbohydrate structure having two sialic acid groups in terminal position is a disialo. A carbohydrate structure having three sialic acid groups in terminal position is a trisialo.

In addition, the antennarity (percentage amount of individual types of branching) was determined after three months of storage (Table 10a) and after six months of storage (Table 10b). A carbohydrate structure having branching and thus having two terminal galactoses is referred to as a biantennary structure. It may be occupied terminally with anything between two sialic acid groups and none. A carbohydrate structure having two branchings and thus terminal galactoses is referred to as a triantennary structure. It may be occupied terminally by zero to three sialic acids.

In addition, the degree of sialylation (percentage occupancy of terminal galactose groups with sialic acid) was also determined after three months of storage (Table 11a) and after six months of storage (Table 11b).

The results show that a slight but reproducible disialylation occurs in storage at a pH of 5. Storage at a pH of 7 does not affect the degree of sialylation.

The afuco component indicated in batches 15 and 16 presumably originates from foreign proteins from the added serum albumin, which was not separated completely by anti- β chromatography.

With regard to the antennarity, there is no measurable influence due to the liquid storage.

Table 9a

Identification	Asialo	Monosialo	Disialo	Trisialo
t_0 value	< 3	13.4	73.4	12.1
Formulation 11	< 3	14.0	74.1	11.9
Formulation 12	< 3	12.5	74.9	11.6
Formulation 13	< 3	16.5	70.4	12.0
Formulation 14	< 3	16.6	71.1	11.1
Formulation 15	< 3	15.8	70.0	13.0
Formulation 16	< 3	15.1	72.0	11.9

Table 9b

Identification	Asialo	Monosialo	Disialo	Trisialo
t_0 value	< 3	13.4	73.4	12.1
Formulation 10	< 3	13.9	70.2	15.3
Formulation 11	< 3	14.5	73.9	11.0
Formulation 12	< 3	14.0	72.4	13.5
Formulation 13	< 3	18.6	68.9	11.7
Formulation 14	< 3	19.0	69.4	10.7
Formulation 15	< 3	17.0	71.0	11.3
Formulation 16	< 3	16.1	71.5	12.4

Table 10a

Identification	Biantennary	Triantennary 1 > 6	Triantennary + 1 repeat
t ₀ value	74.4	18.1	3.7
Formulation 11	72.9	18.7	3.7
Formulation 12	76.9	17.0	2.7
Formulation 13	74.7	18.0	3.1
Formulation 14	75.9	17.3	2.9
Formulation 15	75.2 (incl. 5 % afuco)	18.0	3.3
Formulation 16	75.9 (incl. 5 % afuco)	17.8	3.0

Table 10b

Identification	Biantennary	Triantennary 1 > 6	Triantennary + 1 repeat
t ₀ value	74.4	18.1	3.7
Formulation 10	71.4	19.3	4.0
Formulation 11	73.0	18.7	3.3
Formulation 12	72.3	19.7	3.4
Formulation 13	72.4	19.2	3.4
Formulation 14	74.2	18.7	3.2
Formulation 15	73.0	18.7	2.8
Formulation 16	74.3 (incl. 4 % afuco)	19.7	3.2

Table 11a

Identification	Degree of sialylation
t ₀ value	88.3
Formulation 11	87.0
Formulation 12	88.2
Formulation 13	85.8
Formulation 14	85.8
Formulation 15	86.6
Formulation 16	86.9

Table 11b

Identification	Degree of sialylation
----------------	-----------------------

t ₀ value	88.3
Formulation 10	87.5
Formulation 11	86.6
Formulation 12	87.7
Formulation 13	84.1
Formulation 14	84.3
Formulation 15	85.7
Formulation 16	86.5

Claims

1. A liquid formulation which contains human interferon- β as an active ingredient in a concentration of up to 25 MU/mL and contains a buffer for adjusting the pH value at 5 to 8, is free of human serum albumin and has a long term stability of the biological activity (*in vitro*) of at least 80 % of the initial activity after storage at 25 °C for three months.
2. The liquid formulation containing human interferon- β as the active ingredient and a buffer for adjusting the pH value at 6 to 7.2, is free of human serum albumin and has a long term stability of the biological activity (*in vitro*) of at least 80 % of the initial activity after storage at 25 °C for three months.
3. The liquid formulation which contains human interferon- β as the active ingredient, a buffer for adjusting the pH value at 5 to 8 and one or more amino acids, and has a long term stability of the biological activity (*in vitro*) of at least 80 % of the initial activity after storage for three months for 25 °C.
4. The formulation according to Claim 1, characterized in that it contains a glycosylated interferon- β .
5. The formulation according to Claim 2, characterized in that the interferon- β originates from CHO cells.
6. The formulation according to one of Claims 1 through 5, characterized in that it contains the buffer in a concentration of 10 mmol/L to 1 mol/L.
7. The formulation according to one of Claims 1 through 6, characterized in that it contains a buffer selected from the group consisting of phosphate buffers, citrate buffers and acetate buffers and mixtures thereof.
8. The formulation according to Claim 7, characterized in that it contains a phosphate/citrate buffer.
9. The formulation according to one of Claims 1 and 3 through 8, characterized in that it has a pH between 6 and 7.2.
10. The formulation according to Claim 3, characterized in that it is free of human serum albumin.
11. The formulation according to one of Claims 1 through 10, characterized in that it is free of human or animal polypeptides apart from the active ingredient.
12. The formulation according to one of Claims 1 through 11, characterized in that it is free of surface-active compounds.
13. The formulation according to one of Claims 1 through 12, characterized in that it has chemical integrity after storage for six months at 25 °C.

14. The formulation according to one of Claims 1 through 13, characterized in that it has physical integrity after storage for six months at 25 °C.
15. The formulation according to one of Claims 1, 2 and 4 through 14, characterized in that it also contains one or more amino acids.
16. The formulation according to Claim 3 or 15, characterized in that it contains methionine.
17. The formulation according to Claim 16, characterized in that the methionine is present in a concentration of 0.1 to 4 mmol/L.
18. The formulation according to one of Claims 1 through 17, characterized in that it also contains additives for adjusting the tonicity.
19. The formulation according to one of Claims 1 through 18, characterized in that it also contains thickeners to increase the viscosity.
20. The formulation according to one of Claims 1 through 19, characterized in that it also contains physiologically acceptable preservatives.
21. A pharmaceutical preparation, characterized in that it contains a liquid formulation according to one of Claims 1 through 20.
22. The pharmaceutical preparation according to Claim 21 for oral, parenteral or ophthalmologic application.
23. The pharmaceutical preparation according to Claim 21 or 22 with single doses of 1 to 25 MU.
24. A method of producing a pharmaceutical preparation according to one of Claims 21 through 23, characterized in that a formulation according to one of Claims 1 through 20 and optionally other pharmaceutically necessary additives is prepared and converted to a suitable form of administration.
25. The method of improving the stability of a liquid formulation containing human interferon- β as the active ingredient and a buffer for adjusting the pH value at 5 to 8, characterized in that a formulation which contains one or more amino acids and/or does not contain any human serum albumin is used.
26. The method according to Claim 25, characterized in that the improvement in stability includes an improvement in the long-term stability of the biological activity (*in vitro*), the chemical integrity and/or the physical integrity.

Sequence Protocol

(1) General information:

(i) Applicant

- (A) Name: Dr. Rentschler Biotechnologie GmbH
- (B) Address: Erwin Rentschler Strasse 21
- (C) City: Laupheim
- (E) Country: Germany
- (F) Zip code: D-88471

(ii) Name of the invention: Liquid interferon- β formulations

(iii) Number of sequences: 14

(iv) Computer readable version:

- (A) Data medium: floppy disk
- (B) Computer: IBM PC compatible
- (C) Operating system: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0 version #1.30 (EPA)

(2) Information on sequence ID No.: 1

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 7 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

(B) Map position: 109-115

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 1

Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys

1

5

(2) Information on sequence ID No.: 2:

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 6 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

(B) Map position: 100-109

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 2

Thr Val Leu Glu Glu Lys

1

5

(2) Information on sequence ID No.: 3

(i) Sequence characteristics:

(A) Length: 7 amino acids

(B) Type: amino acid

(C) Form of strand: single strand

(D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

(B) Map position: 46-52

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 3

Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys

1

5

(2) Information on sequence ID No.: 4

(i) Sequence characteristics:

(A) Length: 8 amino acids

(B) Type: amino acid

(C) Form of strand: single strand

(D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

(B) Map position: 116-123

(ix) Feature:

(A) Name/key: modified site

(B) Position: 2

(D) Other information: /product "Xaa = Met (oxidized)"

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 4

Leu Xaa Ser Ser Leu His Leu Lyc

1 5

(2) Information on sequence ID No.: 5

(i) Sequence characteristics:

(A) Length: 8 amino acids

(B) Type: amino acid

(C) Form of strand: single strand

(D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

(B) Map position: 116-123

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 5

Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys

1 5

(2) Information on sequence ID No.: 6

(i) Sequence characteristics:

(A) Length: 12 amino acids

(B) Type: amino acid

(C) Form of strand: single strand

(D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

(B) Map position: 34-45

(ix) Feature:

(A) Name/key: modified site

(B) Position: 3

(D) Other information: /product "Xaa = Met (oxidized)"

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 6

Asp Arg Xaa Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys

1 5 10

(2) Information on sequence ID No.: 7

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 11 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 124-136

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 7

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys

1 5 10

(2) Information on sequence ID No.: 8

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 12 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 34-45

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 8

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys

1 5 10

(2) Information on sequence ID No.: 9

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 14 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 20-33

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 9

Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys

1 5 10

(2) Information on sequence ID No.: 10

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 19 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 1-19

(ix) Feature:

- (A) Name/key: modified site
- (B) Position: 1
- (D) Other information: /product "Xaa = Met (oxidized)"

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 10

Xaa Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln

1 5 10 15

Cys Gln Lys

(2) Information on sequence ID No.: 11

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 19 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 1-19

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 11

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln

1 5 10 15

Cys Gln Lys

(2) Information on sequence ID No.: 12

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 30 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 137-166

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 12

Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg

1 5 10 15

Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

20 25 30

(2) Information on sequence ID No.: 13

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 47 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 53-99

(ix) Feature:

- (A) Name/key: modified site
- (B) Position: 10
- (D) Other information: /product "Xaa = Met (oxidized)"

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 13

Glu Asp Ile Als Leu Thr Ile Tyr Glu Xaa Leu Gln Asn Ile Phe Als

1 5 10 15

Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glue Thr Ile Val

20 25 3

Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ilc Asn His Leu Lys

35

40

45

(2) Information on sequence ID No.: 14

(i) Sequence characteristics:

- (A) Length: 47 amino acids
- (B) Type: amino acid
- (C) Form of strand: single strand
- (D) Topology: linear

(ii) Type of molecule: peptide

(viii) Position in the genome:

- (B) Map position: 53-99

(xi) Sequence description: Sequence ID No. 14

Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala

1 5 10 1

Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val

20 25 30

Glu Asn Leu Leu Als Asn Val Tyr His Cln Ile Asn His Leu Lys

35

40

45

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.